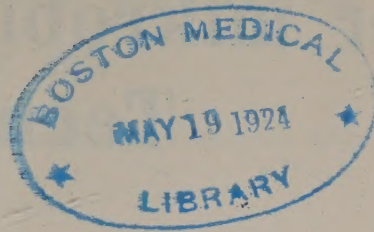
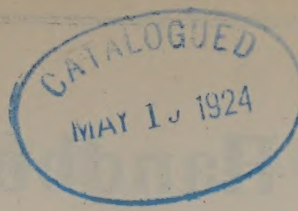


COUNTWAY LIBRARY



HC 4BQP 9



Kraus und Uhlenhuth:

Handbuch der mikrobiologischen Technik

Band I

Handbuch der mikrobiologischen Technik

Unter Mitarbeit hervorragender Fachgelehrten

herausgegeben von

Prof. Dr. Rudolf Kraus

und

Prof. Dr. Paul Uhlenhuth

Direktor des Serotherapeutischen Institutes
in Butantan—San Paolo (Brasilien)

Geh. Rat, Direktor des Institutes für experim.
Therapie Emil v. Behring in Marburg a. d. Lahn

Band I

Abteilung 1, 2, 3 und 4 (Erster Teil)

URBAN & SCHWARZENBERG

BERLIN N 24
FRIEDRICHSTRASSE 105B

1923

WIEN I
MAHLERSTRASSE 4

Das Mikroskop — Färbung Nährböden und Züchtung

Erster Teil

Mit 217 Abbildungen im Text, einer farbigen und 2 schwarzen Tafeln

Bearbeitet von

Dr. K. Beckey	Köln
Dr. M. Berek	Wetzlar
Dr. med. u. phil. Bruno Busson	Wien
Prof. Dr. Doerr	Basel
Prof. Dr. W. v. Drigalski	Halle a. d. Saale
Prof. Dr. Philipp Eisenberg	Krakau
Geh. Rat Prof. Dr. Martin Ficker	Berlin-Dahlem
Prof. Dr. Giemsa	Hamburg
Ober-Reg.-Rat Prof. Dr. E. Gildemeister ..	Berlin
Prof. Dr. Erich Hoffmann	Bonn
Prof. Dr. Felix Jentzsch-Graefe	Giessen
Prof. Dr. Georg Joannovics	Belgrad
Prof. Dr. E. Küster	Oberursel-Taunus
Priv.-Doz. Dr. B. Lipschütz	Wien
C. Metz	Wetzlar
Geh. Rat Prof. Dr. M. Neisser	Frankfurt a. Main
Prof. Dr. W. Nöller	Berlin
Prof. Dr. Heinrich Reichel	Wien
Prof. Dr. W. Scheffer	Berlin
Reg.-Rat Dr. E. Ungermann †	Berlin

URBAN & SCHWARZENBERG

BERLIN N 24
FRIEDRICHSTRASSE 105 B

1923

WIEN I
MAHLERSTRASSE 4

Alle Rechte, ebenso das Recht der Übersetzung
in die russische Sprache, vorbehalten

Printed in Austria.
Copyright, 1923, by Urban & Schwarzenberg, Berlin.
Druck: Christoph Reisser's Söhne, Wien V.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Vorwort von <i>Rudolf Kraus</i> und <i>Paul Uhlenhuth</i>	1
1. Abteilung: Das Mikroskop.	
Geschichte des Mikroskops. Von <i>C. Metz</i> , Wetzlar. Mit 11 Abbildungen im Text	5
Einleitung 5 — Die frühesten Apparate 6 — Das einfache Mikroskop 13	
— Der Ausbau des Mikroskops im 19. Jahrhundert 15	
Das moderne Mikroskop. Von <i>C. Metz</i> , Wetzlar. Mit 11 Abbildungen im Text	20
Einleitung 20 — Die heutigen Objektive 25 — Die Okulare 27 — Die	
Kondensoren 28 — Der Strahlengang 30 — Allgemeine Bemerkungen und	
Anweisungen 33 — Die Überlegenheit der Immersionsobjektive (Elementare	
Erläuterung) 34 — Messung und Zeichnung mit beiden Augen 36 — Die	
binokularen Mikroskope 36 — Das stereoskopische Mikroskop nach Greenough 37	
— Das binokulare Mikroskop von Leitz 38 — Literatur 40	
Nebenapparate des Mikroskops. Von <i>C. Metz</i> , Wetzlar. Mit 10 Abbildungen im Text	41
Die Mikrometer 41 — Die Zeichenapparate 42 — Der Polarisationsapparat 45	
— Das Mikrotom 47	
Über Dunkelfeld- und Ultramikroskopie. Von Prof. Dr. <i>Felix Jentzsch-Graefe</i> ,	
Gießen. Mit 14 Abbildungen im Text	49
Einleitung 49 — Das Wesen der Dunkelfeldbeleuchtung 49 — Die Abbe-	
Helmholtzsche Formel 50 — Die Methode der Dunkelfeldmikroskopie 52 —	
Beschreibung der Apparate 52 — Die Spiegelkondensoren 54 — Handhabung	
des konzentrischen Spiegelkondensors 56 — Lichtquellen 57 — Hell-Dunkel-	
feldkondensor 59 — Dunkelfeldbeleuchtung farbiger Präparate und farbige	
Dunkelfeldbeleuchtung 62 — Optische Methoden zur Größenbestimmung sub-	
mikroskopischer Partikel 67 — Literatur 68	
Die als Leuchtbildmethode bezeichnete Art der Dunkelfelduntersuchung. Von	
Prof. Dr. <i>Erich Hoffmann</i> , Bonn. Mit 1 farbigen Tafel	70
Einleitung 70 — Die Einschaltung der Mattscheibe zwischen Dunkelfeld-	
lampe und Mikroskopspiegel 71 — Die Gründe für die Wirkung der Matt-	
scheibe 71 — Darstellung der Einzelheiten des Verfahrens 71 — Die Über-	
legenheit der Leuchtbildmethode über die Hellfelduntersuchung 74 — Die	
bewährtesten Färbungen 74 — Die Vorteile für Unterricht und Forschung 75	
— Literatur 76	
Die Anwendung der Photographie in der Mikroskopie (Farbenphotographie,	
Diapositive u. s. w.). Von Prof. Dr. <i>W. Scheffer</i> , Berlin. Mit 36 Abbildungen	
im Text	77
Einleitung 77 — Einteilung in drei Dimensionsgruppen 78 — Erläuterung	
dazu 79 — Einteilung und Zusammenstellung der Beleuchtungsmöglich-	
keiten 81 — Beleuchtungsschema 82 — Besprechung der verschiedenen Aus-	
übungsarten der Mikrophotographie 84 — Die zwei Aufnahmeverfahren:	
<i>a)</i> mit einfachen Objektiven; <i>b)</i> mit dem zusammengesetzten Mikroskop 84	
— Die Hauptteile der photographischen Apparate 84 — Die Spiegel- oder	
Reflexkamera 85 — Das Format 87 — Die Hellfeldbeleuchtung 89 — Die	
Dunkelfeldbeleuchtung 89 — Allgemeine Betrachtungen über die Objekt-	
beleuchtung 90 — Die Beleuchtungseinrichtungen 93 — Die Farbfilter 106	
— Zusammenfassung 115	

	Seite
Die Mikrok cinematographie. Von Prof. Dr. <i>W. Scheffer</i> , Berlin	116
Projektion (Makro-, Mikroprojektion). Von Dr. <i>M. Berek</i> , Wetzlar	117
Einleitung 117 — Allgemeine Aufgaben des Beleuchtungsapparates 117 — Lichtquellen 119 — 1. Episkopische Projektion 120 — 2. Diaskopische Projektion 121: <i>a)</i> Makroprojektion 122 — <i>b)</i> Mikroprojektion 123 — Grenzen der Leistungsfähigkeit 123 — Größe der Lichtquelle 124 — Beleuchtungsanordnung 125 — Beleuchtungssystem mit Kollektorwechsel 125 — Beleuchtungssystem mit Kollektor- und Kondensorwechsel 127 — Beleuchtungssystem mit alleinigem Kondensorwechsel 128 — Auswahl der Objektive und Okulare 129 — Kühlvorrichtungen 130 — Der Projektionsschirm 132 — Projektionsapparate 134 — Literatur 135	
Die Untersuchung des ungefärbten Objektes. Hohler Objektträger, heizbarer Objektisch, Tuschepräparat und Dunkelfeldbeleuchtung. Von Dr. med. und phil. <i>Bruno Busson</i> , Wien. Mit 10 Abbildungen im Text . . .	136
Einleitung 136 — Das einfache Deckglas, das Quetsch- oder Zupfpräparat 139 — Der hängende Tropfen 141 — Der heizbare Objektisch 146 — Tuscheverfahren 151 — Die Dunkelfeldbeleuchtung 153	

2. Abteilung: Färbung.

Theorie der Bakterienfärbung. Von Prof. Dr. <i>Philipp Eisenberg</i> , Krakau . . .	161
Einleitung 161 — (Die drei Methoden der Bakterioskopie 181 — Die Bakterienfärbung 161)	
I. Allgemeine Prinzipien der histologischen Färbung	162
A. Über organische Farbstoffe und ihre färberischen Eigenschaften . . .	162
B. Theorien des Färbprozesses	169
Die chemischen Theorien 170 — Die physikalischen Theorien 174	
C. Allgemeines über Färbungsmethoden und die Beurteilung ihrer Resultate	179
1. Singuläre (monochromatische) Färbungen 180 — 2. Kombinationsfärbungen (polychromatische Färbungen) 182 — <i>a)</i> Sukzessive Kombinationsfärbungen 182 — <i>b)</i> Simultane Kombinationsfärbungen 182	
II. Allgemeine Grundlagen der Bakterienfärbung	184
A. Über Fixierung und Färbung im allgemeinen	185
1. Fixierung 185 — 2. Die zur Bakterienfärbung verwendbaren Farbstoffe 186 — 3. Beizen 183: <i>a)</i> Die Wirkungen der Beizen auf Bakterien 188 — <i>b)</i> Einwirkungen der Beizen auf die Farbstoffe 191 — 4. Entfärber 196	
B. Über differentielle Bakterienfärbungen	201
1. Über die Gramdifferenzierung und ihren Mechanismus 201 — 2. Färbung der Säurefesten 215 — 3. Die differentielle Strahlenpilzfärbung 225 — 4. Färbung der Spirochäten 225	
C. Über die Differenzierung der Bestandteile der Bakterienzelle	226
1. Sporenfärbung 226 — 2. Geißelfärbung 228 — 3. Membran, Kapsel, Ektoplasma 229 — 4. Volutingranula 231 — 5. Kerne und andere Granula 235 — 6. Fett, Granulose, Glykogen 236 — 7. Über die färberische Differenzierung verschiedener physiologischer Zustände und Funktionen der Bakterien 237 — 8. Die Bedeutung des Substrats 240	
Anhang: Negativdarstellung der Bakterien	242
Literatur	247
Über Vitalfärbung von Bakterien. Von Prof. Dr. <i>Philipp Eisenberg</i> , Krakau . .	257
Literatur	265
Methoden der Bakterienfärbung im Ausstrich. Von Geh.-Rat Prof. Dr. med. <i>Martin Ficker</i> , Berlin-Dahlem. Mit 14 Abbildungen im Text	267
Einleitung	267
I. Vorbereitendes	268
1. Deckgläser und Objektträger	268
Reinigung von fetthaltigen Deckgläsern 268 — Reinigen von Deckgläsern für die Geißelfärbung 269 — Reinigen gebrauchter Deckgläser 271	

	Seite
2. Die gebräuchlichsten Farblösungen und ihre Herstellung	272
A. Einfache Lösungen 272 — B. Zusammengesetzte und verstärkte Farblösungen 273	
II. Das gefärbte Ausstrichpräparat	275
1. Schema der Herstellung gefärbter Ausstrichpräparate von Kulturen auf festen Nährböden	275
2. Ausstrichpräparate von Kulturen auf flüssigen Nährböden, ferner von Blut, Eiter, Sputum, Gewebssäften, Pflanzeninfusen u. s. w.	275
a) Ausstreichen einer Öse oder Nadelspitze direkt auf dem Glas ohne Wasser 275 — b) Abziehpräparate 275 — c) Herstellung von Blutausstrichen 275 — d) Organausstrichpräparate 276 — e) Tupfpräparate 276 — f) Gewebssaftausstriche 276 — g) Ausstrichpräparate von Milch 277	
3. Bemerkungen zu der schematischen Vorschrift	277
1. Die Bakteriensuspension 277 — 2. Das Trocknen 277	
III. Fixation von Ausstrichpräparaten	277
1. Durch Wärme	277
2. Fixation durch Chemikalien	278
Fixation von Bakterienausstrichen (Kultur, Gewebe u. s. w.) durch chemische Reagenzien 279: 1. Durch Lösungen — 2. Durch Dämpfe 279 — Fixierung nach Weidenreich 280 — Vereinfachung durch Hamm 280	
IV. Die Färbung	281
Auswahl des Farbstoffes 281 — Kontrastfärbungen für Ausstrichpräparate 283	
V. Wasserspülung und Trocknung	284
VI. Konservierung von Ausstrichpräparaten	285
1. Ungefärbte Präparate	285
2. Konservierung gefärbter Präparate	286
VII. Besondere Färbemethoden	287
1. Gramsche Färbung	287
2. Methoden der Strukturfärbung	291
a) Ektoplasma 291 — b) Geißelfärbung (s. S. 329) — c) Endoplasma 292 — Färbung von Protoplasmaeinschlüssen 292 — Färbung der Polkörnchen oder Babes-Ernstschen Körperchen der Diphtheriebacillen 293 — Einzeitige Methoden (Färbung und Farbmischungen) .	296
3. Färbung des Volutins	296
4. Fetteinschlüsse	298
Kernfärbung 299	
5. Polfärbung	300
Polfärbung bei Ausstrichen von Pest und der Pasteurelle-Gruppe 300	
6. Färbung einzelner Bakterienarten	301
1. Diphtheriebacillen 301 — 2. Färbung von Gonokokkenausstrichen 301	
7. Doppelfärbungen	304
1. Doppelfärbungen mit getrennten Farben 304 — 2. Doppelfärbungen mit Farbmischungen 306 — Andere Verstärkungen für Fuchsin 313 — Abänderung der Entfärbung und Gegenfärbung 314 — Verwendung von Pikrinsäure 316 — Entfärbung durch alkalische Mittel nach Färbung mit Carbol-fuchsin 317 — Alkalifestigkeit nach Gasis 318 — Färbungen mit Krystall-violett und Grammodifikationen 319 — Differenzierungsmethoden 325	
Literatur	327
Methoden der Geißel-, Kapsel- und Sporenfärbung. Von Geh.-Rat Prof. Dr. Martin Ficker, Berlin-Dahlem. Mit 1 Abbildung im Text.	329
I. Geißelfärbung	329
1. Geschichtliches	329
2. Technik der Geißelfärbung	330
Verwendung absolut sauberer Deckgläser 330 — Verwendung geeigneter Kulturen 330 — Geeignete Präparation 331 — Fixation 332	
3. Darstellung der Geißeln	333
A. Färbemethoden	333
B. Darstellung durch Metallsalze	338

	Seite
II. Kapselfärbung	341
1. Methoden mit Essigsäure	343
2. Färbung mit Erhitzen oder besonderer Differenzierung	344
3. Metachromatische Darstellung und Doppelfärbungen	345
Doppelfärbungen zur Kapseldarstellung	346
4. Kombinationen von Färbung mit Tusche oder kolloidalem Silber	347
5. Kapselfärbungen nach besonderer Fixation	348
6. Anwendung von Beizen	350
III. Sporenfärbung	350
1. Sporendarstellung durch Kochen in Farblösungen	351
2. Kochen in Farblösungen nach vorausgehender Beizung	354
Literatur	356
Methoden zur Färbung der Protozoen. Von Prof. Dr. <i>Giemsa</i> , Hamburg. Mit 3 Abbildungen im Text	358
Einleitung	358
I. Fixierungs- (Härtungs-)Mittel	358
Die wichtigsten Fixierungsmittel: 1. Alkohol 359 — 2. Aceton 359 — 3. Methylalkohol 359 — 4. Äther 359 — 5. Sublimat 360 — 6. Forma- lin 361 — 7. Osmiumsäure 361 — 8. Chromsäure 363 — 9. Pikrin- säure 363 — 10. Benzolsuperoxyd 364	
II. Verwendungsformen von Material (Schnitte, Feucht- u. Trocken- präparate)	364
A. Schnitte	364
B. Feuchtpräparate	364
C. Trockenpräparate	365
1. Der dünne Ausstrich 365 — 2. Der dicke Tropfen 366	
III. Aufbewahrung ungefärbter und gefärbter Ausstriche	366
IV. Färbvorschriften	367
A. Singuläre Färbung	367
B. Panoptische (polychromatische) Simultan- und Sukzessivfärbung, sowie Beizenfärbungen	367
V. Versilberung	377
A. Levaditimethode (für Schnitte)	377
B. Methode nach Bertarelli und Volpino (für Schnitte)	378
C. Methode nach Fontana (für Trockenausstriche)	378
VI. Das Tuscheverfahren	378
VII. Vitalfärbung	379
Literatur	379
Die mikroskopische Darstellung des filtrierbaren Virus (Chlamydozoa- Strongyloplasmen). Von Priv.-Doz. Dr. <i>B. Lipschütz</i> , Wien	381
I. Allgemeiner Teil	381
1. Nachweis des filtrierbaren Virus im nativen Präparat	384
2. Die intravitale Färbung	385
3. Mikroskopischer Nachweis im gefärbten Ausstrichpräparat	385
4. Histologischer Nachweis des filtrierbaren Virus	388
5. Mikroskopischer Nachweis in der Kultur	390
6. Mikroskopische Darstellung der „Gewebeeinschlüsse“	391
II. Spezieller Teil	392
1. Lokalisierte epidermale bzw. epitheliale Vira	392
2. Dermotrope Vira	396
3. Neurotrope Vira	402
Literatur	410
Methoden der Färbung von Mikroorganismen im Schnitt. Von Prof. Dr. <i>Georg Joannović</i> , Belgrad	413
Einleitung	413
Färbetechnik	418
a) Methoden der einfachen Bakterienfärbung	418
b) Methoden der Doppelfärbung, elektive Methoden der Bakterienfärbung	420

	Seite
c) Besondere Färbungsmethoden	423
1. Für säurefeste Bakterien, vor allem Tuberkelbacillen 423 — 2. Für <i>Bacillus leprae</i> 427 — 3. Für Kokken 427 — 4. Für <i>Bacillus anthracis</i> 427 — 5. Für <i>Bacillus mallei</i> 428 — 6. Für <i>Bacillus pestis bubonicae</i> 429 — 7. Für <i>Bacillus influenzae</i> 429 — 8. Für <i>Bacillus typhi abdominalis</i> 429 — 9. Für <i>Bacillus scleromatis</i> 430 — 10. Für den Ducreyschen <i>Bacillus</i> (<i>Ulcus molle</i>) 430 — 11. Für den Nekrosebacillus (<i>Bacillus necroseos</i>) 430 — 12. Für <i>Streptothrix actinomyces</i> 431 — 13. Für Hautpilze 431 — 14. Für Blastomyceten 432 — 15. Für Spirochäten 432 — 16. Für die Negrischen Körperchen bei Lyssa 434 — 17. Für die Guarnierischen Körper bei Variola 434 — 18. Für Ruhr-Amöben 435 — 19. Für die <i>Rickettsia Prowazeki</i> bei Typhus exanthematicus 435	
Literatur	435
Entkeimung (Sterilisation und Desinfektion mit Ausschluß der Filtration). Von Prof. Dr. <i>Heinrich Reichel</i> , Wien. Mit 12 Abbildungen im Text	437
Einleitung	437
I. Ausübung der Entkeimungsmethoden im Laboratorium	438
1. Sterilisation im Laboratorium	439
a) Sterilisation von Geräten 439 — b) Sterilisation von Flüssigkeiten 445	
2. Desinfektion im Laboratorium	452
II. Mikrobiologische Prüfungsmethoden von Entkeimungsverfahren	456
1. Praktische Kontrollmethoden	457
a) Kontrolle der Sterilität 457 — b) Kontrolle der Desinfektion 460	
2. Wissenschaftliche Prüfungsmethoden	461
a) Allgemeine Anforderungen 461 — b) Beschreibung der Methoden 470: (Das Testmaterial 470 — Die Exposition 475 — Vermeidung der Entwicklungshemmung 484 — Die Nachkultur 488)	
III. Forschungsmethoden	490
1. Methoden der Beschreibung	490
a) Aufnahme der Wirkungskurven 490 — b) Absterbekurven 498 — c) Desinfektionswertberechnungen 503	
2. Methoden der Erklärung	507
a) Deutung der Wirkungskurven 507 — b) Temperatureinfluß 509 — c) Lösungsgefüge 510 — d) Phasengleichgewichte 513	
Anhang: Kurze Anleitung zur praktischen Prüfung flüssiger Desinfektionsmittel	517
Prüfungsverfahren flüssiger Desinfektionsmittel	517
Literatur	521—532

3. und 4. Abteilung: Nährboden und Züchtung.

Nährböden. Von Ober-Reg.-Rat Prof. Dr. <i>E. Gildemeister</i> , Berlin-Dahlem. Mit 10 Abbildungen im Text	535
A. Allgemeine Regeln für die Herstellung von Nährböden	535
I. Einleitung	535
II. Neutralisieren und Alkalisieren der Nährböden	537
III. Filtration der Nährböden	542
IV. Klärung der Nährböden	545
V. Abfüllen der Nährböden	546
VI. Menge der anzufertigenden Nährböden	548
VII. Aufbewahrung der fertigen Nährböden	548
VIII. Nährbodenbuch	548
B. Generelle Nährböden	549
I. Nährböden aus Fleischwasser	549
1. Fleischwasser 549 — 2. Nährbouillon 550 — 3. Nährgelatine 553 — 4. Nähragar 556 — 5. Ersatzpräparate für Fleisch und Pepton 558 — 6. Zusätze zu Fleischwassernährböden 568	

	Seite
II. Verwendung von Blut zu Nährböden	570
III. Verwendung von Blutserum zu Nährböden	573
IV. Verwendung sonstiger tierischer Flüssigkeiten zu Nährböden	579
V. Verwendung von Eiern zu Nährböden	580
VI. Verwendung von Kartoffeln und sonstigen pflanzlichen Produkten zu Nährböden	583
VII. Eiweißfreie Nährmedien	586
C. Spezielle Nährböden	588
I. Spezialnährböden für Tuberkelbacillen	588
a) Nährböden zur Erstzüchtung 588 — b) Nährböden zur Weiterzüchtung 590 — c) Albumosefreie Nährböden 592	
II. Spezialnährböden für Diphtheriebacillen	593
III. Spezialnährböden für Typhusbacillen (Paratyphus und Ruhrbacillen)	595
IV. Spezialnährböden für Choleravibrionen	610
V. Spezialnährböden für Influenzabacillen	615
VI. Spezialnährböden für Keuchhustenbacillen	616
VII. Spezialnährböden für Ducreysche Stryptobacillen	617
VIII. Spezialnährböden für Meningokokken	617
IX. Spezialnährböden für Gonokokken	618
X. Spezialnährböden für Pneumokokken	620
XI. Spezialnährböden für Anaerobier	620
XII. Spezialnährböden für pathogene Pilze	622
XIII. Spezialnährböden für Spirochäten	623
XIV. Spezialnährböden für Amöben	626
XV. Spezialnährböden für Leishmanien	626
XVI. Spezialnährböden zur Züchtung von Flagellaten	627
XVII. Spezialnährböden für Wasseruntersuchungen	628
Anhang: Regenerierung von Agar	629
1. Regenerierung von Endo-Agar nach Mohorčič	630
Modifikation dieses Verfahrens nach Serger	631
2. Regenerierung von Endo- und Drigalski-Conradi-Agar nach Guth	632
3. Regenerierung von Agar und Drigalski-Conradi-Agar nach Baerthlein	633
4. Regenerierung von Endo-Agar nach Rieckenberg	634
5. Regenerierung von Agar und Endo-Agar nach Stößner	635
6. Regenerierung von Endo-Agar und Malachitgrün-Agar nach Kuhn und Jost	635
7. Regenerierung von Drigalski-Conradi-Agar, Endo-Agar und Malachitgrün-Agar nach Friedmann	636
8. Regenerierung von Metachromgelb-Dreifarbennährböden nach Zeißler und Gaßner	638
9. Regenerierung von Endo-Agar, Drigalski-Conradi-Agar und Malachitgrün-Agar nach Zipfel	640
10. Wiedergewinnung von gebrauchtem Agar nach Kaunitz und Möbier	641
Literatur	643
Die Züchtung der tierischen Parasiten und Krankheitserreger auf künstlichen Nährböden. Von Prof. Dr. W. Nöller, Berlin. Mit 1 schwarzen Tafel	647
I. Die Züchtung der parasitischen Protozoen	647
1. Allgemeiner Teil	649
2. Spezieller Teil	649
a) Die Züchtung der Amöben	649
b) Die Züchtung der Flagellaten	651
Die Darmflagellaten	651
Die Züchtung der Blutflagellaten und ihrer nächsten Verwandten:	653
1. Die Trypanoplasmen	653
2. Die Leishmanien und Leptomonaden aus Wirbeltieren	653
3. Insektenleptomonaden	656
4. Die Züchtung der Trypanosomen und Crithidien	657
Die Temperatur 660 — Das Blut in den Nährböden 661 — Der Agar 663 — Die Nährflüssigkeiten zur Agarbereitung oder zur unmittelbaren Mischung mit dem Blute 664 —	

Die osmotischen Eigenschaften der Nährlösungen	664 —
Der Säuregrad der Nährflüssigkeit nach der Mischung mit Blut	665 — Die Rolle des Traubenzuckers 666 — Spezielles über die Züchtung der verschiedenen Trypanosomenarten 666: Erste Gruppe 667 — Zweite Gruppe 672
c) Die Züchtung der Coccidien und Hämosporiden	674
d) Die Züchtung der parasitischen Infusorien	676
3. Die wichtigsten Nährböden für die parasitischen Protozoen	677
a) Die Nährböden für die Amöbenzüchtung	677
b) Die Nährböden für die Blutflagellaten	678
1. Nährböden für die Leishmanien	678
2. Nährböden für die Trypanosomen	679
c) Die Nährböden für Plasmodien und Piroplasmaen	683
II. Die Züchtung von parasitischen Würmern auf künstlichen Nährböden	684
Literatur	685
Differentialdiagnostische Nährböden: Arten und Herstellung. Von Professor Dr. W. v. Drigalski, Halle a. d. Saale	693
Allgemeines	693
I. Die Herstellung der einzelnen differentialdiagnostischen Nährmittel	699
II. Nährmedien mit Verwendung von Blut oder Milch	702
III. Beobachtung von Oxydations- oder Reduktionswirkungen	704
IV. Nährmedien mit Zusatz von Kohlehydraten	707
Einzelne Herstellungsvorschriften	708
Literatur	719
Trocken- und Konservennährböden. Von Prof. Dr. Doerr, Basel	721
Literatur	731
Allgemeines über die Ernährung und Züchtung der Mikroorganismen. Von Reg.-Rat Dr. E. Ungermann †, Berlin	732
Brutschränke und Thermoregulatoren (Apparate zur Züchtung). Von Prof. Dr. med. u. Dr. med. vet. E. Küster, Oberursel i. T. Mit 37 Abbildungen im Text	761
Das Plattenverfahren. Von Geh.-Rat Prof. Dr. Max Neisser, Frankfurt a. M., und K. Beckey, Köln. Mit 36 Abbildungen im Text	797
Geschichtliches	797
Die verschiedenen Formen von Platten- und plattenähnlichen Schalen	799
Das Gußverfahren	803
Das Plattenausstrichverfahren	809
Literatur	817



Vorwort.

Daß die Mikrobiologie aus bescheidenen Anfängen heraus in so kurzer Zeit zu einem so weit umfassenden Wissensgebiet angewachsen ist, verdanken wir außer *Louis Pasteur* in erster Linie den epochemachenden Arbeiten unseres *Robert Koch*. Während *Louis Pasteur* durch seine grundlegenden Untersuchungen über die Fäulnis und Gärung, über die Krankheiten des Weines und der Seidenraupen auf die Existenz bestimmter mit spezifischen Eigenschaften begabter Arten in dem Chaos der niedersten Lebewesen hingewiesen und die praktische Bedeutung der Unterscheidung und Trennung der einzelnen Arten zum klaren Ausdruck gebracht hatte, war es *Robert Koch*, der die ätiologische Bedeutung der Mikroorganismen als Erreger bestimmter Infektionskrankheiten experimentell begründet hat, indem er die geeigneten Methoden schuf, mit denen es erst möglich wurde, exakte Beweise für die spezifische Wirkungsweise der Mikroorganismen zu erbringen. Diese Methoden, unter denen vor allem die Verbesserung der optischen Hilfsmittel, die Verwendung der homogenen Ölimmersion, des *Abbeschen* Beleuchtungsapparates, die Ausbildung der Mikrophotographie, die Methoden der Reinkultur auf festen erstarrenden Nährböden, die spezifische Färbung mit Anilinfarben und die Methoden der Sterilisation und Desinfektion an erster Stelle zu nennen sind, bildeten den Schlüssel für die weitere Erforschung der Mikroorganismen. „Nachdem ich dieselben — so sagt *Robert Koch* in seiner Antrittsrede in der preußischen Akademie der Wissenschaften — möglichst weit entwickelt und mich damit eingeübt hatte, ging ich an ihre Verwendung zum Studium der pathogenen Mikroorganismen, und es gelang dann mir und meinen Mitarbeitern, in rascher Folge die Erreger und damit die Ätiologie einer Anzahl von Infektionskrankheiten zu entdecken, von denen ich nur die Wundinfektionskrankheiten, Tuberkulose, Cholera, Typhus, Diphtheritis nennen will. Diese Entdeckungen, welche, nachdem die richtigen Methoden gefunden waren, uns gewissermaßen wie reife Früchte in den Schoß fielen, wurden dann auch für praktische Zwecke möglichst ausgenutzt; so für die Seuchenbekämpfung, wie sie in bezug auf Cholera, Typhus, Malaria mit Erfolg ausgeübt wird; ferner für die spezifische Prophylaxis und Behandlung der Infektionskrankheiten, teils direkt mit Präparaten, welche aus der Bakterienkultur gewonnen

werden, teils direkt durch Vermittlung von Tieren, welche, nachdem sie mit Hilfe der Bakterienkulturen immunisiert sind, den Heilstoff in ihrem Blutserum enthalten.“

Mit Staunen und Bewunderung schauen wir auf diese glänzenden Erfolge, die durch so verhältnismäßig einfache Methoden erzielt wurden. Dazu bedurfte es des Genies eines *Robert Koch*. In seinen Bahnen wandelnd, haben dann vor allem seine Schüler die Methodik weiter ausgestaltet und ausgebaut, und damit die Bahn freigemacht für weitere ruhmreiche Entdeckungen. Wir brauchen nur an die Namen *v. Behring*, *Löffler*, *Gaffky*, *Ehrlich* u. a. zu erinnern, um diese Fortschritte in der Lehre der Mikrobiologie zu kennzeichnen.

Trotz der großen Bedeutung, welche die Ausbildung der Methoden, die gleichsam das Rüstzeug des Forschers darstellen, beansprucht, muß es auffallen, daß die mikrobiologische Technik und Methodik unter einheitlichen Gesichtspunkten in einem größeren Werk bisher nicht zusammengefaßt worden ist. Diese Lücke soll das vorliegende Handbuch ausfüllen. Und da sehen wir nun hier vor unseren Augen die Methodik als festes Fundament — und als einzelne Bausteine — des gewaltigen Gebäudes der mikrobiologischen Wissenschaft und erkennen auch, wo noch Bausteine fehlen, wo solche einzufügen oder durch neue zu ersetzen sind. Diese Betrachtung gibt uns den Ansporn zu weiterer Verbesserung der alten und zur Auffindung neuer Methoden. Und diese sollte man nicht nur ausfindig zu machen bestrebt sein, um ganz bestimmte vorgesteckte Forschungsziele damit zu erreichen; sondern auch jede zufällig gemachte Beobachtung, jede neu gefundene experimentelle Tatsache, und auch jeder technische Fortschritt auf optischem Gebiet, in der Färbung oder Züchtung etc. sollte eingehend daraufhin geprüft werden, ob sich nicht Methoden daraus entwickeln lassen, die uns gestatten, weitere tiefere Einblicke in die Geheimnisse des Lebens der Mikroorganismen zu tun, wie das ja schon öfters in ungeahnter Weise der Fall war.

Die Mikrobiologie, die aus der Bakteriologie heraus sich entwickelt hat, umfaßt nicht nur die *Schizomyceten*, sondern auch die Pilze und Hefen, die Protozoen und das filtrierbare Virus. Die diesbezüglichen Untersuchungsmethoden sind daher — unter besonderer Berücksichtigung optischer Hilfsmittel — in erster Linie Gegenstand der Darstellung, u. zw. soweit sie für die Medizin (einschließlich Veterinärmedizin) und Hygiene eine Bedeutung beanspruchen. Im Anschluß daran sind auch die mikrobiologischen Methoden der Untersuchung des Bodens, des Wassers, des Abwassers, der Luft sowie auch der Milch eingehender gewürdigt. Auch war es notwendig, die für den Mikrobiologen sehr wichtigen Methoden der Chemotherapie, der Tumorforschung, der Untersuchung von krankheitsübertragenden Insekten und der anderen Schädlinge (Würmer) sowie auch die physikochemischen und

häm at o l o g i s c h e n Untersuchungsmethoden, die ja mit der Mikrobiologie in untrennbarer Beziehung stehen, ausführlich zu behandeln. Die Methoden der Immunitätsforschung sind nur so weit berücksichtigt, als sie zur Diagnose der menschlichen und tierischen Infektionskrankheiten von Bedeutung sind. Schließlich schien es uns auch von Wichtigkeit, Umschau zu halten in den Stätten der mikrobiologischen Forschung und bakteriologischen Untersuchungsanstalten (einschließlich der Lymphgewinnungsanstalten und des Instituts für Gärungsgewerbe), um ihr wissenschaftliches Rüstzeug, ihre Einrichtungen und ihren Betrieb im einzelnen kennen zu lernen.

Bei der gewaltigen Ausdehnung, die unsere Wissenschaft genommen hat, war es nicht immer leicht, die richtige Abgrenzung des Stoffes und der Einzelgebiete zu finden, da vielfach auch die gleichen Methoden auf den verschiedensten Gebieten der Mikrobiologie mit Vorteil verwendet werden. Wiederholungen ließen sich daher nicht ganz vermeiden.

So glauben wir, daß das vorliegende Werk ein vollständiges und anschauliches Bild gibt von der hohen Entwicklung und Bedeutung unserer Wissenschaft, die es wohl verdient, daß man ihr noch mehr wie bisher, auch an den Universitäten, würdige Forschungs- und Lehrstätten bereitet. Deutscher Forschergeist war es mit in erster Linie, der die Mikrobiologie auf diese stolze Höhe gehoben hat; sorgen wir dafür, daß wir auch weiterhin die Führerrolle behalten, aufschauend zu unserem großen Meister *Robert Koch*. —

Mit Trauer gedenken wir eines unserer Mitarbeiter, des Herrn Dr. *Ungermann*, dessen Tod wir zu beklagen haben. Er war unter den jüngeren Bakteriologen der Besten einer. Das Manuskript seiner Arbeit, das in seinem Nachlaß fast druckfertig vorlag, ist das letzte wissenschaftliche Dokument dieses um die Wissenschaft so hochverdienten Mannes.

Ein besonderes Bedürfnis ist es uns, der Verlagsbuchhandlung von *Urban & Schwarzenberg*, die in der bekannten großzügigen Weise auf alle unsere Wünsche eingegangen ist und das Werk — dessen Herausgabe sich durch den Weltkrieg leider verzögerte — trotz der Ungunst der äußeren Verhältnisse so hervorragend ausgestattet hat, auch an dieser Stelle unseren besten Dank auszusprechen.

Rudolf Kraus
São Paulo

Paul Uhlenhuth
Marburg (Lahn)

1. Abteilung:

Das Mikroskop.

Geschichte des Mikroskops.

Von C. Metz, Wetzlar.

Mit 11 Textabbildungen.

Unter Mikroskop im engeren Sinn versteht man das zusammengesetzte Mikroskop, bestehend aus Objektiv und Okular. Das vom Objektiv entworfene reelle Bild wird vom Okular nochmals vergrößert. Das einfache Mikroskop besteht aus einer mehr oder minder starken einfachen oder mehrfachen Linse und wird heute noch häufig als Lupe, besonders zum Präparieren, benutzt. Zum ersten Male wurde die vergrößernde Kraft, wie sie die Lupe liefert, an einer mit Wasser gefüllten Glaskugel, unserer heutigen Schusterkugel, erkannt. Von dieser vergrößernden Wirkung schreibt der im 1. Jahrhundert n. Chr. lebende *Seneca* (Quaest. nat. I, 6): *Literae quamvis minutae et obscurae per vitream pilam aqua plenam majores clarioresque cernuntur.*

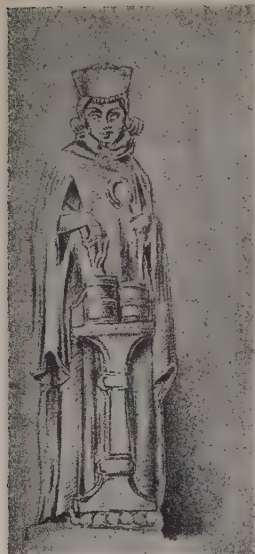
Auch die Beobachtung, daß Gegenstände, welche in runden, mit Wasser gefüllten Glasgefäßen schwimmen, vergrößert erscheinen, war den Alten, wie ebenfalls *Seneca* (Quaest. nat. I, 6) schreibt, wohlbekannt: *Poma formosiora quam sunt videntur si innatant vitro.* Aber die Erklärung finden die Alten nicht in der kugeligen oder zylindrischen Gestalt der Gefäße, sondern schreiben die Wirkung dem Wasser zu, wie es *Seneca* an derselben Stelle ausdrücklich ausspricht: *Illud adjiciam, omnia per aquam videntibus longe esse majora.*

Den Alten blieb also das Wesen dieser Vergrößerung verborgen; sie machten auch von dieser vergrößernden Kraft keinen Gebrauch, wohl aber benutzten sie mit Wasser gefüllte Glaskugeln und Sammelgläser zu Brennzwecken, wie aus mehreren Stellen des *Seneca* und seines Zeitgenossen *Plinius* hervorgeht. Noch eine viel ältere Nachricht der Brennwirkung des Glases bietet eine Stelle aus *Aristophanes* „*Wolken*“. Erst viel später sehen wir die Welt sich die vergrößernde Wirkung der Linsen zu nutze machen.

So erwähnt *Roger Baco* (1214—1294) Lesegläser; er kennt sie aus dem Werk des arabischen Gelehrten *Alhazen* über Optik (996—1021). Erst gegen Ende des 13. Jahrhunderts sehen wir *k o n v e x e* Gläser als Brillen und Lesegläser verwendet. Sie sind in der Regel bestimmt gewesen für ältere, weitsichtige Personen. Wir bemerken eine Lupe oder Leseglas an einem gotischen Bildwerk vom Anfang des 14. Jahrhunderts, das sich im sog. Heiligen Grab des Domes zu Konstanz findet

und das *Gottfried Kinkel* in den Bonner Jahrbüchern, Heft 60, 1877, S. 121 ff. bekannt machte. Unter anderen Gestalten, welche in den Osterspielen des Mittelalters auftraten, begegnen wir hier der Person des Doktor Ypocras mit akademischem Barett und Doktormäntelchen, der den heiligen Frauen Salben und Spezereien verkauft. Der fahrende

Fig. 1.



Doktor Ypocras mit der Lupe.

Quacksalber rührt mit der Rechten die Salben, während die Linke die Lupe hält, die wohl noch seinen gelehrten Aufputz vervollständigen sollte.

Das konkave Brillenglas für Kurzsichtige kommt erst gegen Mitte des 16. Jahrhunderts zur Einführung. Die Entwicklung der Brillenmacherkunst bereite die Erfindung des Mikroskops wie auch des Fernrohrs vor und einem Brillenmacher, *Zacharias Janssen* aus Middelburg, verdankt man gegen Ende des 16. Jahrhunderts die Erfindung beider Instrumente, auf die ein glücklicher Zufall ihn führte, indem er die ihm zur Verfügung stehenden positiven und negativen Linsen in passender Weise kombinierte.

Porta in seiner *Magia naturalis* (Ausgabe 1553—1589) hatte schon auf den Nutzen der Vereinigung von zwei Linsen, einer konvexen und konkaven hingewiesen. Schon vor *Porta* schreibt *Fracastorius* in der *Homocentrica* 1538: *Per duo specilla ocularia si quis perspiciat, altero alteri superposito, majora multo et propinquiora videbit omnia* (*Servus*, Geschichte des Fernrohrs, S. 7 ff.).

So kamen beide Instrumente zustande, u. zw. bildeten das Fernrohr, wie wir ziemlich bestimmt wissen, eine einfache Objektiv- und eine einfache negative Augenlinse. Es ist dies das holländische Fernrohr, das auch nach *Galilei*, der es verbesserte und zuerst der Astronomie dienstbar machte, das *Galileische* genannt wird.

Über den Bau des ersten Mikroskops sind wir weniger genau unterrichtet.

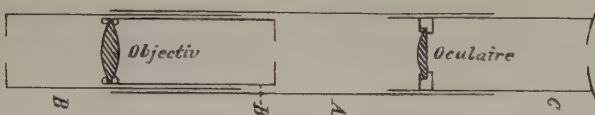
Wilde, in seiner *Geschichte der Optik*, S. 151, glaubte daraus, daß das erste Fernrohr eine negative Augenlinse besessen hat, schließen zu können, daß auch die Augenlinse des Mikroskops eine negative Linse gewesen sei; da man aber ziemlich sicher weiß, daß die ersten Mikroskope ein umgekehrtes Bild gegeben haben, so ist auch die Augenlinse des ersten Mikroskops eine Sammellinse gewesen (*Harting*, Geschichte des Mikroskops, III, S. 98).

Es würde kein Zweifel mehr über den Bau des ersten Mikroskops bestehen, wenn das der Wissenschaftlichen Gesellschaft von Zeeland zu

Middelburg gehörende Instrument wirklich ein Mikroskop von *Janssen*, für das es gilt, vorstellt.

Dasselbe war in der Ausstellung wissenschaftlicher Apparate in London 1876 und in der Antwerpener Ausstellung 1891 zu sehen. Das Objektiv ist eine bikonvexe Linse von $3\frac{1}{2}$ Zoll Brennweite (*van Heurck*,

Fig. 2.



Mikroskop von Janssen.

The Microscope, S. 343) und das Okular eine plankonvexe Linse von 3 Zoll Brennweite. Die Tuben mit dem Objektiv und Okular sind in einer Röhre gegeneinander verschiebbar; drei Blenden sind schon in ziemlich sachgemäßer Weise in der Objektebene, dem Augenort und zwischen Objektiv und Okular vorgesehen. Dieses erste Instrument würde man heute eher als Ablesemikroskop oder Ablesefernrohr als ein Mikroskop im engeren Sinn bezeichnen. Erst bei dem weitesten Abstand von 260 mm, den das Instrument verträgt, ergibt sich eine vierfache Vergrößerung. Bei mittlerem Abstand erhält man ein astronomisches Fernrohr und bei kürzerem Abstand eine Lupe. Es läßt sich aber wohl verstehen, daß *Janssen*, dem diese Wirkung seiner Gläser nicht entgehen konnte, ein Fernrohr, das umgekehrte Bilder ergab, da man doch zunächst nur an einen Gebrauch für terrestrische Zwecke mit einem solchen Instrument denken konnte, nicht brauchbar fand. So wurde dieses, das sog. astronomische Fernrohr, von *Kepler* 1611 auf rein theoretischem Weg gefunden und in wohlverdienter Weise auch nach ihm genannt. Das Instrument von *Janssen*, das schon eine wesentliche Verbesserung gegenüber dem Middelburger darstellt, und das *Petrus Borellus* in seiner Schrift: „De vero telescopii inventore“ 1655 beschreibt (*Harting*, III, S. 22), besaß schon einen $1\frac{1}{2}$ Fuß langen Tubus, der von drei metallenen Delphinen getragen wurde. Die Ebenholzplatte,

Fig. 3.



Mikroskop von Hooke.

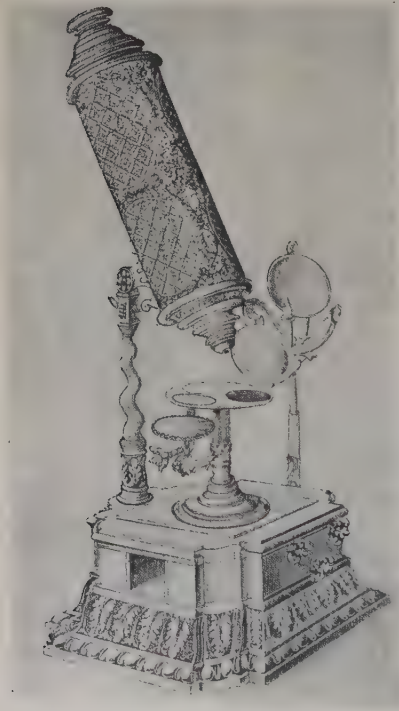
auf der sich die Delphine erhoben, diente zugleich als Objektisch.

Die erste Abbildung, die wir von einem Mikroskop besitzen, findet sich mit der Beschreibung in der *Micrographia* von *Robert Hooke*, 1665. Das Instrument zeigt optisch und mechanisch schon eine Einrichtung, die sich etwa 50 Jahre mit geringen Änderungen erhielt. Es war für auffallendes Licht eingerichtet, das Objekt konnte durch eine Öllampe, deren Licht durch eine Wasserkugel und eine plankonvexe Linse auf das Objekt geleitet wurde, beleuchtet werden. Die grobe Einstellung des Stativs geschah durch Schiebung des Tubus an einer Säule *C*, die feine Einstellung durch ein Gewinde, das durch den Ring *G*, welcher den Tubus trug, führte. An einem auf der Fußplatte des Mikroskops beweglichen und festklemmbaren Tisch ließ sich das Objekt mittels der Nadel feststecken. Das Objektiv war eine einzelne stark abgeblendete bikonvexe Linse und das Okular bildeten zwei ebenfalls bikonvexe Linsen. Von einem gleichzeitigen englischen Mikroskop sind die optischen Daten bekannt, welche die fehlenden des *Hookeschen* Mikroskops ersetzen können. Die Brennweite des Objektivs betrug 25 mm. Das Okular bestand aus zwei bikonvexen, nahezu gleichen, um ihre Brennweite von

40 mm voneinander abstehenden Linsen. Es entsprach einem heutigen mittelstarken Okular und ergab mit dem Objektiv bei dem langen Tubus von nahezu 400 mm, den das *Hookesche* Instrument bei Benutzung sämtlicher vier Auszüge auch erreichen konnte, eine nur 100fache Vergrößerung.

Einen Fortschritt bedeutet *Tortonas* Mikroskop 1685, das zur Beobachtung im durchfallenden Licht eingerichtet war. Eine weitere Vervollkommnung zeigen die Instrumente von *Bonanni* 1691 und *Marshall* 1704: für die Beobachtung im durchfallenden Licht benutzten sie einen Beleuchtungsapparat, bestehend aus Lampe und Sammellinse, ähnlich wie ihn schon *Hooke* für auffallendes Licht verwandte. *Bonannis* Instrument war horizontal, *Marshall's* wie gewöhnlich vertikal gerichtet. Einen wesentlichen Schritt brachte *Hertel*, 1716, das

Fig. 4.



Mikroskop von Hertel.

Mikroskop in seiner Entwicklung vorwärts. Er stattete zuerst das Mikroskop mit einem beweglichen Beleuchtungsspiegel aus. Er schuf damit die Einrichtung, wie sie noch heute unentbehrlich ist, und welche die bequeme Beleuchtung eines Objekts bei durchfallendem Licht gestattet. Schon die äußere feine Ausstattung des Mikroskops verrät, welche Sorgfalt der Herstellung desselben gewidmet war. Vertraut mit der Technik der optischen Instrumente, wie es seine „Anweisung zum Glass-Schleifen“ bezeugt, bekannt mit den besten Mikroskopen der damaligen Zeit war es *Hertel* möglich, ein für diese Zeit so vorzügliches Instrument zu schaffen. Zur Aufnahme der Objekte bei der Untersuchung im durchfallenden Licht war auf dem drehbaren Objektisch eine plane und konkave Glasscheibe — letztere diente als feuchte Kammer — vorgesehen. Eine Ebenholz- und eine Elfenbeinscheibe auf dem Objektisch ließen das Objekt bei auffallendem Licht in dem gewünschten Kontrast erscheinen. Für diese auffallende Beleuchtung diente eine Lampe, deren Licht von einem Hohlspiegel parallel reflektiert und von einer plankonvexen Linse auf das Objekt geworfen wurde. Mit der an der Vorderseite des Kastens sichtbaren Schraube konnte durch Drehung, Hebung und seitliche Bewegung des Tisches das Objekt unter dem Mikroskop eingestellt werden. Mittels Gelenk konnte das Instrument geneigt werden. Ein schwach vergrößerndes Okular aus zwei bikonvexen Linsen, dem *Ramsden*-Typus verwandt, gab mit einem Objektiv von 25 mm Brennweite bei dem eingeschobenen Tubus von 180 mm eine nur 40fache Vergrößerung. *Hertel* übertrug auch zuerst das Okular-Schrauben-Mikrometer, dessen man sich schon am Fernrohr bediente, auf das Mikroskop. Die komplizierte Einrichtung zum Einstellen konnte dem *Hertelschen* Mikroskop keine größere Verbreitung verschaffen. Beliebter wurden die englischen Mikroskope, von denen wir die von *Culpeper* und *Scarlet* um 1730 und die von *Sterrop* und *Cuff* um 1750 verfertigten näher beschreiben. Das Instrument von

Fig. 5.

Mikroskop von *Culpeper* und *Scarlet*.

Culpeper und *Scarlet* hat folgende Einrichtung. Auf dem kastenförmigen Fuß von Holz erheben sich drei geschweifte Säulchen, welche den Tisch und auf ihm wieder drei ähnliche Säulchen, welche die Schiebhülse tragen. In dieser weiten Hülse bewegt sich der Tubus. Diese Einstellung durch Tubusschiebung, die das Instrument zum ersten Male aufweist und die sich in der Folgezeit einer so großen Beliebtheit erfreute, ist schon mit Federung in der Hülse versehen, eine Einrichtung, die erst eine sichere Einstellung auf die Dauer gewährleistet. Zur groben Einstellung dient die Markierung 1, 2, 3, 4, 5 auf dem Tubus. Diese Zahlen entsprechen den Nummern der fünf Objektive, mit denen das Mikroskop versehen ist.

Fig. 6.



Gerätschaften des Mikroskopikers um 1750.

Stellte man die Marke auf dem Tubus, welche dem angeschraubten Objektiv entsprach, in die Höhe des oberen Randes der Hülse, so erschien schon das Bild im Gesichtsfeld; es war somit mit erster Annäherung eingestellt. Für durchfallendes Licht diente ein Planspiegel; er besaß zum Neigen und Drehen schon die heute noch gebräuchliche Einrichtung mittels des drehbaren Bügels. Zur Beleuchtung mit direkt auffallendem Licht war eine Linse in gleicher Fassung wie der Spiegel an dem Tisch des Instruments bestimmt. Eine zweite Vorrichtung zur Beleuchtung undurchsichtiger Gegenstände war durch den kleinen Hohlspiegel gegeben, den *Lieberkühn* 1738 für diese Zwecke eingerichtet hatte, dessen sich aber schon *Leeuwenhoek* früher am einfachen Mikroskop bedient hatte. Dieser Spiegel (s. Nr. 3, Fig. 6) war an einer Hülse gefaßt, die über den unteren kurzen, schmalen Tubus des Mikroskops gesteckt wurde. Auch hier sorgte eine Markierung wie bei der Einstellung der Objektive für die richtige Stellung des Spiegels bei Benutzung der verschiedenen Objektive. Der Rand der Hülse wird auf die Nummer geschoben, welche mit dem zur Beobachtung benutzten Objektiv übereinstimmt. Das Instrument war ausgerüstet mit fünf Objektiven von der Brennweite 4·4, 9·4, 15·6, 20·5, 26·6 mm und einem fest in den Tubus gefaßten schwach vergrößernden Okular von

Stellte man die Marke auf dem Tubus, welche dem angeschraubten Objektiv entsprach, in die Höhe des oberen Randes der Hülse, so erschien schon das Bild im Gesichtsfeld; es war somit mit erster Annäherung eingestellt. Für durchfallendes Licht diente ein Planspiegel; er besaß zum Neigen und Drehen schon die heute noch gebräuchliche Einrichtung mittels des drehbaren Bügels. Zur Beleuchtung mit direkt auffallendem Licht

Huyghensscher Form mit der Blende innerhalb des Okulars. Die Gesamtvergrößerungen betragen 201, 90, 52, 38·5, 28·5.

Die Fig. 6 zeigt die Geräte, welche zur Ausstattung des Mikroskops gehörten und in der Schublade im Fußgestell des Mikroskops verwahrt wurden. Sieben dieser Apparate waren zur Befestigung auf dem Tisch bestimmt. In die zentrale Öffnung des Tisches paßte die Klemme 1 zum Halten des Präparatenträgers 12. Zur Verengerung der Tischöffnung, also als Blende, die hier zum ersten Mal erscheint, diente der Trichter 2, der auf einer kurzen Hülse unter dem Mikroskop aufgesteckt wurde. Unter dem Tisch befanden sich zwei Klammern zum Halten des Glases 16, das zur Untersuchung von Objekten in Wasser diente. Die beiden Löcher am Rand des Tisches waren zur Aufnahme der schon erwähnten Beleuchtungslinse 4 und zur Befestigung des Nadel- und Pinzettenhalters 15 bestimmt. Letztere konnte auch mittels des aus vier beweglichen Gliedern bestehenden Halters 11 auf den Tisch aufgesetzt werden. Ein bei der Ausstattung der Instrumente damaliger Zeit unentbehrliches Gerät war die Fischplatte 6. Sie diente zur Befestigung des Fischchens, dessen Blutkreislauf man in seiner Schwanzflosse beobachten wollte. Die Platte besaß an der Unterfläche einen Knopf, mit dem sie in dem knopfgabelförmigen Schlitz des Tisches aufgesteckt und durch eine Feder festgeklammt wurde. Eine kleine Büchse 3 enthielt die runden Deckgläschen aus Marienglas und die Ringe, mit denen die Gläschen im Objektträger festgehalten wurden. Eine Holzbüchse zur Aufbewahrung von Präparaten 9, eine Pinzette 14, ein kleines Netz 13 zum Fischen von Infusorien u. s. w., ein Quetschglas 8 und eine feuchte Kammer 7 vervollkommeten die Ausstattung des Instruments.

Einen weiteren Fortschritt in seinem Ausbau weist das Mikroskop von *Sterrop* auf, das als *Cuff*-Mikroskop weitere Verbreitung fand. Der Fortschritt betrifft hauptsächlich die beiden Einstellungen.

Auf dem Holzfuß erhebt sich eine feste Stange. An derselben gleitet vertikal eine bewegliche Schiene. An ihrem oberen Ende ist der Tubusträger, durch den die feste Stange führt, befestigt. Dieser trägt in einer ringförmigen Öffnung den Tubus. Den Tubusträger verbindet eine Schraube mit einer Hülse, welche sich über Schiene und Säule schiebt und mit einem Zeiger versehen ist. Die feste Säule trägt entsprechend den verschiedenen Objektiven die mit den Zahlen 1—6 versehenen Marken. Die grobe Einstellung erhielt man, wenn man den Zeiger auf die Marke schob, welche dem zu benutzenden Objektiv entsprach. Nach dieser groben Einstellung wurde durch eine seitliche Klemmschraube die Hülse an der festen Säule angeklammt. Die feine Einstellung bewirkte sodann die Tubusträger und Hülse verbindende Schraube.

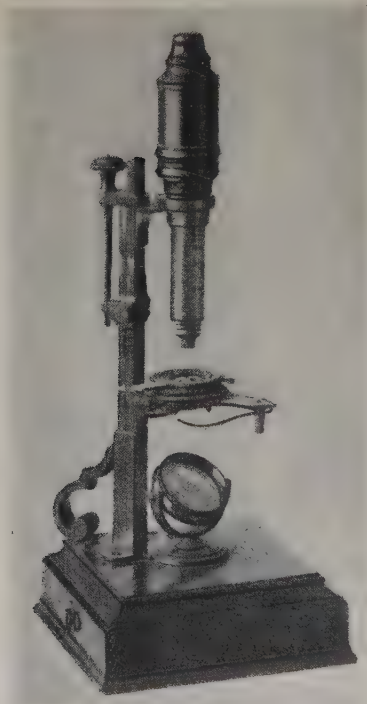
Das *Cuff*-Instrument wäre dem vorigen mit seiner feinen Einstellung überlegen gewesen, wenn nicht der störende tote Gang der Schraube aufgetreten wäre. Überlegen aber war das *Cuff*-Mikroskop darin, daß

Tisch und Spiegel freier zugänglich waren. Die Ausrüstung des Instruments war ganz dieselbe, wie die des vorigen. Der Spiegel war ein Hohlspiegel, das Huyghenssche Okular ($f = 44 \text{ mm}$) hatte eine mittlere Vergrößerung. Sechs Objektive von der Brennweite 32, 21, 13, 8, 5 und 3.3 mm ergaben mit dem Okular eine 21—250fache Vergrößerung. Einen Einblick in die optische Ausrüstung des Mikroskops gewährt der Querschnitt Fig. 8.

Unter den Optikern gegen Ende des 18. Jahrhunderts, welche sich durch ihre Instrumente einen Namen machten, sind zu nennen der

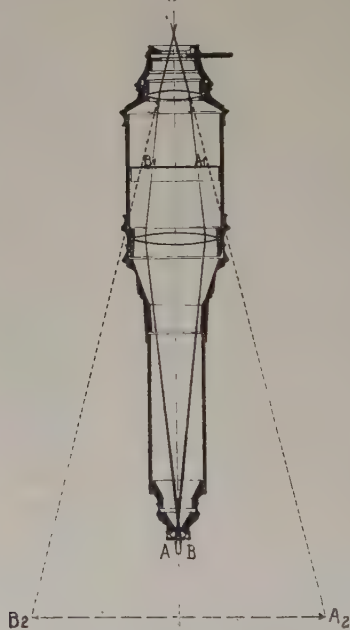
Holländer *Dellebarre* und die Engländer *Martin*, *Adams* und *Jones*. Am bemerkenswertesten an den Mikroskopen der letzteren ist die

Fig. 7.



Mikroskop von Sterrop und Cuff.

Fig. 8.



Querschnitt durch das Cuff-Mikroskop.

drehbare Scheibe am unteren Ende des Tubus. Sie trug die Objektive; es war die erste Einrichtung, die sich zu dem heute unentbehrlichen Revolver entwickelt hat. In Deutschland sind hauptsächlich *Brander* in Augsburg und *Burucker* in Nürnberg zu nennen. Besondere Erwähnung verdient ihr Zeichenapparat; das Bild des mit direktem Sonnenlicht beleuchteten Objekts wurde auf eine matte Scheibe projiziert und konnte so nachgezeichnet werden.

Die mechanische Arbeit an den Instrumenten der genannten Meister hatte sich noch vervollkommenet, die zum ernsten Arbeiten bestimmten

Instrumente waren ganz aus Metall und auch der Holzfuß war nun verschwunden. Der Strahlengang (Fig. 8) zeigt, wie dürftig noch die Leistung eines solchen Instruments sein mußte, das so dünne Strahlenbündel AA' und BB' aufwies. Durch eine enge Blende wurde das Strahlenbündel am Objektiv soweit abgeblendet, daß die Reste der sphärischen und chromatischen Abweichung, für deren Hebung man noch keine wirksamen Mittel kannte, nicht allzu störend wurden. Der Öffnungswinkel dieses Bündels betrug auch für starke Objektive noch nicht 10° . Die Auflösung konnte deswegen auch nur sehr beschränkt sein. An dem bekannten Testobjekt, der Flügelschuppe von *Macroglossa stellatarum*, konnten knapp nur die Längsstreifen, welche einen Abstand von 2.6μ besitzen, gelöst werden. Das Objektiv bestand aus der einfachen bikonvexen, von zwei gleichseitigen Kugelflächen gebildeten Linse. Von einer Zentrierung war noch keine Rede, die Linse wurde in eine ausgesparte Höhlung eingelegt und von einem verschraubbaren Hütchen festgeklemt. Diese einfachste Form des Objektivs hatte sich noch als die brauchbarste erwiesen. Mancherlei Versuche, welche man angestellt hatte, die Leistung des Mikroskops zu heben, hatten zu greifbaren Erfolgen nicht geführt. Durch gefärbte und Rauchgläser hatte man versucht, die Farbenabweichung zu dämpfen. Die Theoretiker hatten Gläser mit elliptischen, parabolischen und hyperbolischen Flächen in Vorschlag gebracht, um die sphärische Abweichung zu heben. Man hatte statt der Glaslinsen solche aus Bergkrystall und Edelsteinen geschliffen, ohne Erfolg zu erzielen. An der Stelle der einzelnen Objektivlinsen hatte man Linsensätze versucht. Der berühmte Mathematiker *Euler* hatte sich mit der Berechnung solcher Objektive befaßt; aber die mathematische Behandlung war noch nicht umfassend genug, um der praktischen Optik nützlich zu sein.

Das einfache Mikroskop.

Ehe wir uns dem zweiten Abschnitt in der Entwicklung des zusammengesetzten Mikroskops zuwenden, in dem erst das Instrument durch die Achromasie der Linsen eine ungeahnte Vervollkommnung erreichen sollte, müssen wir einen Blick werfen auf das einfache Mikroskop, dem die Wissenschaft in dieser frühen Zeit eine Reihe wichtiger Entdeckungen verdankt und das lange ein starker Konkurrent des zusammengesetzten noch chromatisch und sphärisch unkorrigierten Mikroskops gewesen ist. Die einfachen Bikonvexlinsen, welche beim zusammengesetzten Mikroskop das Objektiv bildeten, konnten als Lupen verwendet eine etwa 10—60fache Vergrößerung liefern. Eine solche Lupe zeigt die Fig. 9. Die stark abgeblendete Linse von $\frac{1}{2}$ Zoll Brennweite ergab eine 24fache Vergrößerung. Das Objekt ist an der Spitze eines federnden Drahtes befestigt. Dem Holländer *Anton van Leeuwenhoek* gelang es um 1673 die Leistung dieses Instruments ganz bedeutend zu erhöhen. Er verstand es, sehr starke bikonvexe Linsen zu schleifen.

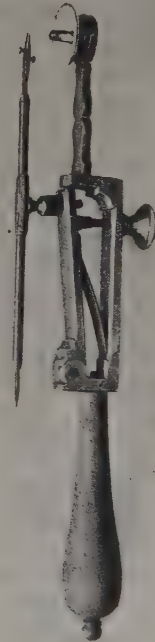
Mit der stärksten erreichte er eine 270fache Vergrößerung. Die mit solchen abgeblendeten Linsen erreichte Auflösung war etwa die doppelte derjenigen, zu welcher man mit dem damaligen Mikroskop gelangt war. Überlegen blieb das zusammengesetzte Mikroskop dem einfachen darin, daß es für die Beobachtung bequemer und für Messungen viel geeigneter war. Dem war es auch wohl zu verdanken, daß das zusammengesetzte Mikroskop neben dem optisch überlegenen einfachen Mikroskop sich behaupten konnte. Zu den berühmten Verfertign einfachen Mikroskope rechnen die beiden *Muschenbroek*, *Samuel* und *Johann*. Letzterer goß sich seine Linsen, welche feine Glas-kügelchen waren, nach dem Verfahren, welches *Hooke* 1665 empfohlen hatte. *Hertel* schliiff 1716 den gegossenen Kügelchen eine Plan-

Fig. 9.



Einfaches Lupenstativ.

Fig. 10.



Mikroskop von Lieberkühn.

fläche an. Seine Linsenform entspricht der heutigen Halbkugel, welche man bei stark vergrößernden Taschenmikroskopen verwendet, die uns noch eine gute Vorstellung von der Leistung dieser damaligen einfachen stark vergrößernden Mikroskope geben können. In Deutschland machte sich *Lieberkühn* einen Namen durch seine stark vergrößernden Linsen. Er stattete das Instrument bei Beobachtung im auffallenden Licht mit dem Hohlspiegelchen 1738 aus, dessen sich allerdings auch schon *Leeuwenhoek* bedient hatte.

Die Fig. 10 zeigt ein in guter Messingarbeit ausgeführtes einfaches Mikroskop von *Lieberkühn*. Mit dem festen mit Handgriff versehenen

Linsenhalter ist der durch Schraube und Feder verstellbare Objekthalter verbunden. Letzterer, bestehend aus Nadel und federnder Klemme, ist verschiebbar und um ein Kugelgelenk drehbar. Das Mikroskop ist mit vier Linsen ausgestattet, die schwächeren sind plankonvex, die stärkeren bikonvex. Jede Linse ist in einem *Lieberkühnschen* Hohlspiegel, welcher das reflektierte Licht in der Objektebene sammelt, fest gefaßt. Die Linsen geben eine 15-, 30-, 50- und 120fache Vergrößerung.

Das einfache Mikroskop nimmt dem zusammengesetzten Mikroskop gegenüber heute nur noch eine untergeordnete Stellung ein. In Verbindung mit einem einfachen Stativ dient es zum Präparieren, zu Untersuchungen in feinen technischen Betrieben und zur Beobachtung bei botanischen und petrographischen Exkursionen.

Man begnügt sich meist mit Vergrößerungen, die schwächer sind als die des Mikroskops. Unter die Lupen aus einem Glas, an denen man mit verschiedenen Mitteln die Aberrationen zu heben versucht hat, zählen die heute nur noch selten benutzten Lupen nach *Stanhope*, *Coddington* und *Brewster*.

Die gebräuchlichsten Lupen sind heute folgende:

1. die einfache Plankonvexlinse;
2. die aus zwei solchen Linsen zusammengesetzte *Fraunhofersche*;
3. zwei achromatische Doppellinsen;
4. die *Steinheilsche* Lupe, eine dreifache verkittete Linse;
5. die *Brückesche* Lupe, ein achromatisches Objektiv in Verbindung mit einer negativen Augenlinse.

Der Ausbau des Mikroskops im 19. Jahrhundert.

Das Mikroskopstativ war gegen Ende des 18. Jahrhunderts schon zu einem so vollkommenen Werkzeug ausgebildet, daß auch eine viel bessere optische Einrichtung, als die damalige Zeit bot, mit ihm ausgenutzt werden konnte. Eine neue Epoche brach für das Instrument an mit der Möglichkeit, auch den optischen Apparat zu verbessern. Dieser bedeutendste Fortschritt, den je die Optik erfuhr, bestand in der Achromatisierung der Linsen, an welche die sphärische Korrektion unmittelbar anknüpfte.

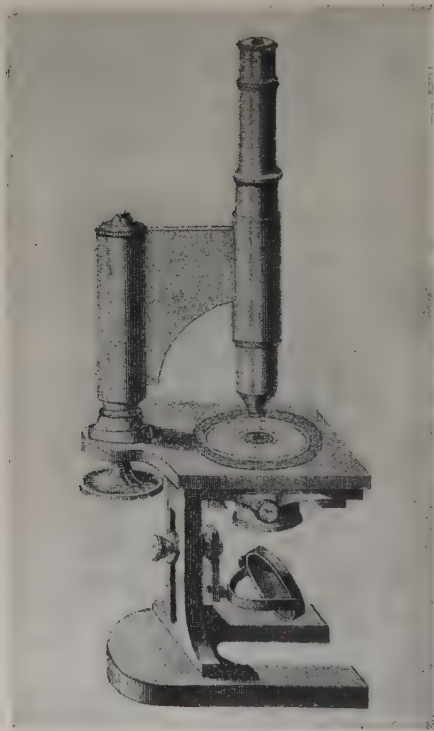
Schon *Euler* (1747) hatte aus dem Korrektionszustand des Auges, das man damals als frei von Farbenabweichung halten mußte, geschlossen, daß man auch durch die Zusammensetzung der Objektive aus mehreren Gläsern ein achromatisches Linsensystem müßte herstellen können.

Als es *Klingenstierna* 1754 gelungen war, durch Kombinierung von zwei Prismen ein solches anzufertigen, welches Ablenkung ohne Farbenzerstreuung gab, da wurde endlich 1757 durch *Dollond* die Aufgabe gelöst, ein Objektiv zu schaffen, welches ein Bild ohne Farbenabweichung ergab. Durch die Vereinigung einer negativen Linse aus

bleihaltigem, schwerem Glas, dem sog. Flintglas, das eine starke Dispersion zeigte, und Glas von geringerer Brechung und geringerer Dispersion, dem Kronglas, war diese Wirkung erreicht. Es ergab sich aber auch bald, daß eine solche Linsenkombination auch zugleich ermöglichte, besonders durch die richtige Wahl des inneren meist verkitteten Bogens, die sphärische Abweichung zu heben.

Von dieser Erfindung zog aber zunächst nur das Fernrohr Nutzen und fast noch 50 Jahre dauerte es, bis es den Holländern *Beeldsnyder*

Fig. 11.



Mikroskop von Oberhäuser.

und *van Deyl* gelang, ein achromatisches Mikroskopobjektiv herzustellen. Noch einmal begann sich das Objektiv vom Fernrohrobjektiv aus zu entwickeln. Tastend schritt die praktische Optik von den schwächer vergrößernden Objektiven zu den stärker vergrößernden fort. Das stärkste Objektiv, welches *Fraunhofer* in München 1811 lieferte, besaß eine Brennweite von 16 mm. *Sellique* ließ 1824 von *Chevalier* Objektive herstellen, die aus einem System von mehreren achromatischen Doppellinsen bestanden. Es wurde dadurch zum ersten Male der Weg gezeigt, auf dem das Mikroskopobjektiv erst zu seiner späteren hohen Vervollkommenheit gelangen sollte. Einen neuen Objektivtypus schuf *Amici*, der die Halbkugel als Frontlinse einführte. Diese Linse in Verbindung mit zwei hinteren Doppellinsen wurde der Typus des starken Trockensystems.

Der Deutsche *Oberhäuser*, der in Paris seine Werkstätte hatte, erlangte einen hohen Ruf durch die Objektive, die er schuf. Es gelang ihm, sehr starke und leistungsfähige Objektive herzustellen. Das Stativ war unterdessen verbessert worden, um diesen so sehr erhöhten Leistungen der Objektive gerecht zu werden. Das hier abgebildete große Stativ von *Oberhäuser* (Fig. 11) zeigt die bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts erreichten Fortschritte im Bau des Stativs, der dem modernen Stativ schon sehr nahesteht. Seine Einfachheit und Zweckmäßigkeit zeichnen es aus. Es ist das Instrument, das durch seine Einfachheit und seine Gestalt in so scharfen Gegensatz zu dem englischen Stativ trat

und das als Urform des kontinentalen Mikroskops wohl bezeichnet werden kann. Wir sehen an dem Stativ den seitdem so beliebt gewordenen Hufeisenfuß. Der geräumige viereckige Tisch dreht sich mit dem Mikroskopoberteil um die optische Achse. Die grobe Einstellung geschieht durch Schiebung des Tubus in seiner Hülse, die feine durch eine Mikrometerschraube, deren Konstruktion mittels Spiralfeder und Schraube sich in den wesentlichsten Teilen bis heute erhalten hat. In einen Schlitten unter dem Tisch werden die verschiedenen Blenden eingeschoben. Der Plan- und Hohlspiegel läßt sich vertikal und seitlich bewegen.

Unermüdlich waren die Optiker bemüht, die Leistung der Objektive zu erhöhen, bei vollendeter sphärischer und chromatischer Korrektion den Öffnungswinkel zu vergrößern und mit ihm die Helligkeit und die Auflösung des Objektivs zu steigern.

Einen wesentlichen Fortschritt auf diesem Weg stellt die Wasserimmersion dar, die von *Amici* (1850) eingeführt, von *Hartnack*, dem Nachfolger *Oberhäusers*, in großer Vollendung hergestellt wurde. Noch einen größeren Erfolg errang die Optik durch die Einführung des Ölimmersionsobjektivs. Von verschiedenen Seiten hatte man erkannt, daß man mit einer stärker brechenden Flüssigkeit als Wasser, wenn sie zwischen Objektiv und Deckglas trat, eine noch höhere Auflösung erhalten müsse. Als günstigstes Medium wurde das Zedernholzöl erkannt, dessen Brechung mit der des Deckglases gleich ist. Neben der erhöhten numerischen Apertur bietet dieses Objektiv, das homogene Ölimmersionsobjektiv, auch den Vorteil, daß jede Deckglaskorrektion überflüssig wurde. Da Deckgläser nicht immer in normaler Dicke zu erhalten sind, so hatte man bisher häufig für abweichende Deckgläser bei Trocken- und Wasserimmersionsobjektiven eine Korrektionsfassung vorgesehen, welche durch die Möglichkeit, die Linsen des Objektivs gegeneinander zu verschieben, den verschiedenen Deckglasdicken Rechnung trug.

Noch ein anderes Mittel, den durch abweichende Deckgläser entstehenden Mangel an sphärischer Korrektion zu beheben, besteht darin, daß man die Tubuslänge mittels des Tubusauszuges ändert. Diesem Zweck diente auch damals hauptsächlich dieser Auszug und nicht mehr wie früher dem, die Vergrößerung in weiterem Umfang zu variieren.

Ein solches Objektiv, zu dem *J. W. Stephenson* in London die Anregung gab, brachte die optische Werkstätte von *C. Zeiß* in Jena auf Grund der Berechnung von *E. Abbe* zu großer Vollendung.

Für Immersionsobjektive hatte sich noch ein besonderer Konstruktionstypus ausgebildet, der des Duplexfrontsystems, in welchem zur einfachen Fronthalbkugel noch eine Einzellinse, die jetzt in der Regel ein Meniscus ist, trat. Wir müssen jetzt einen kurzen Blick werfen auf die hauptsächlichsten Leistungen *Abbes* (geb. 23. Januar 1840, gest. 14. Januar 1905), durch welche die Mikroskopoptik eine so außerordent-

liche Förderung in dem letzten Jahrzehnt des letztverflossenen Jahrhunderts erfuhr, und welche diesem verdienstvollen Manne unvergänglichen Ruhm sichern. Seine Theorie der mikroskopischen Bilderzeugung (1873) erhob unser Wissen von der Wirkungsweise des Mikroskops weit über die elementare geometrische Optik, wie sie bis jetzt galt, welche zur Darstellung der Bilderzeugung beim Fernrohr und beim photographischen Objektiv ausreicht. *Abbe* zeigte die Bedingungen, unter denen ein durch Beugungserscheinungen erzeugtes Bild erst dem Objekt ähnlich sein könne. Er wies nach, daß die auflösende Kraft des Mikroskops abhängig ist von der numerischen Apertur des Objektivs, dem Produkt $n \cdot \sin u$, dem Medium zwischen Deckglas und Frontlinse des Objektivs und dem Sinus des halben Öffnungswinkels des Objektivs. Es ward dadurch der Optik der richtige Weg gewiesen, die Leistung des Mikroskops zu erhöhen, nämlich durch die Steigerung der Apertur und nicht etwa durch eine unbegrenzte Erhöhung der Vergrößerung des Objektivs. Er stellte gleichzeitig mit *Helmholtz* die Grenzen fest, welche der Leistungsfähigkeit des Mikroskops gesteckt sind. Diese Untersuchungen ergaben, daß außer der Erhöhung der numerischen Apertur auch noch die Wahl des Lichtes, mit dem man beobachtet, eine große Rolle bei der Auflösung spielt und daß die Verwendung von violetterm und noch mehr ultravioletterm Licht die Auflösung des Objektivs steigern müsse.

Neben einer Reihe von Meß-, Hilfs- und Nebenapparaten, welche er für die praktische Optik schuf, unter denen sein Zeichenapparat, Beleuchtungsapparat und Apertometer hier am meisten interessieren, nehmen die *Apochromate* noch eine besonders hervorragende Stelle ein.

Das Glasmaterial in hinreichender Weise sowohl in Hinsicht des Brechungs- als auch des Zerstreungsvermögens in Rechnung zu ziehen, war schon früher gelungen durch die Entdeckung der dunklen Linien im Spektrum durch *Fraunhofer* 1817. Mit diesen Größen konnten auf Grund der damaligen Kenntnis der optischen Gesetze einfachere optische Instrumente, Fernrohre und photographische Objektive errechnet werden, wie dies durch *Fraunhofer*, *Seidel* und *Steinheil* geschehen war. Aber nachdem erst durch die dioptrischen Untersuchungen von *Gauß* 1840 die Gesetze der Abbildung durch ein System einer beliebigen Anzahl zentrierter Linsen ermittelt und diese *Gaußsche* Theorie noch von einer Reihe hervorragender Gelehrten und zuletzt auch von *Abbe* selbst weiter ausgebaut war, gelang es *Abbe* das Mikroskopobjektiv der Berechnung zugänglich zu machen.

So waren die Radien, Dicken und Abstände der Linsen der *Apochromate*, die Brechungen und Dispersionen der Gläser allein auf Grund der Berechnung bestimmt. Bisher waren die Optiker bei der Konstruktion ihrer Objektive auf das mühselige und umständliche Probieren angewiesen. Die Feinheit der durch die Rechnung erzielten Korrektur, die hohe Apertur der *Apochromate*, die Erfüllung der Sinusbedingung, die *Abbe* zuerst gefordert hatte, waren es nicht, was die Überlegenheit

der Apochromate vor den bisherigen Objektiven in der Hauptsache bedingte. Der praktische Optiker hatte bisher auch ohne Kenntnis der theoretischen Gesetze, fast nur geleitet von einem feinen Verständnis für die Leistung seiner Objektive, recht gute Objektive geschaffen. So fand sich bei einer rechnerischen Nachprüfung älterer Objektive auch die Sinusbedingung erfüllt; durch das Anstreben einer möglichst großen Ebnung des Bildes war diese Forderung unbewußt erfüllt worden. Was den wesentlichen Fortschritt bei diesen Objektiven gegenüber den früheren ausmachte, war das Material, die neuen Gläser und vornehmlich der Fluorit, aus dem sie geschaffen waren.

Abbe, der in *Schott* eine kräftige Stütze seiner Bestrebungen fand, erweiterte durch Einführung neuer Grundbestandteile, wie Phosphor- und Borsäure, die Anzahl der den Optikern bis jetzt zur Verfügung stehenden Gläser ganz wesentlich. Unter diesen Gläsern befanden sich eine Reihe von Glaspaaren, welche sich als Kron- und Flintgläser eigneten und in denen die Dispersionen ein konstanteres Verhältnis zeigten; sie boten die Möglichkeit, das sekundäre Spektrum zu beseitigen.

Zur leichteren Errechnung und feineren Durchführung der Korrekturen in optischen Instrumenten erschmolzen weiter *Abbe* und *Schott* Gläser, welche bei gleicher Brechung verschiedene Dispersionen und verschiedene Brechung bei gleicher Dispersion aufweisen. Auch das machte sich für die praktische Optik recht geltend, daß von nun an bei jeder Schmelzung die optischen Konstanten mit großer Genauigkeit ermittelt wurden, während man bisher zur Kennzeichnung der Gläser oft nur mit der Angabe des spezifischen Gewichts sich begnügte. Aber noch in viel höherem Maße, als es die neuen Gläser vermochten, hat der Fluorit, der in den Apochromaten zur Verwendung kam, ihre Leistung gehoben. Dieses einfach brechende Mineral zeigt die sehr geringe Brechung von 1.43 und eine außerordentlich günstige Dispersion. Es genügt schon, eine negative Linse von der Brechung 1.50 mit einer schwach brechenden positiven Fluoritlinse zu vereinigen um die sphärische Korrektion an der Kittfläche zu heben. Unter diesen leichter brechenden Gläsern aber finden sich zur Hebung der chromatischen Korrektion solche, deren Spektrum viel proportionaler mit dem des Fluorits verläuft, als bei den bisherigen Kron- und Flintgläsern der Achromate. Es tritt also in den Apochromaten an die Stelle eines Flintglases ein Kronglas und die Stelle des letzteren nimmt der Fluorit ein. Aber die durch günstig gewähltes Glas und Fluorit gebotene Möglichkeit der Aufhebung des sekundären Spektrums war nur voll auszunutzen, wenn man den Objektiven einen verwickelteren Bau gab. Der günstige Verlauf des Spektrums in Fluorit und Glas gestattete drei Strahlen des Spektrums in den Apochromaten zur Vereinigung zu bringen, während bisher in den Achromaten nur zwei Strahlen zur Vereinigung gekommen waren.

Das moderne Mikroskop.

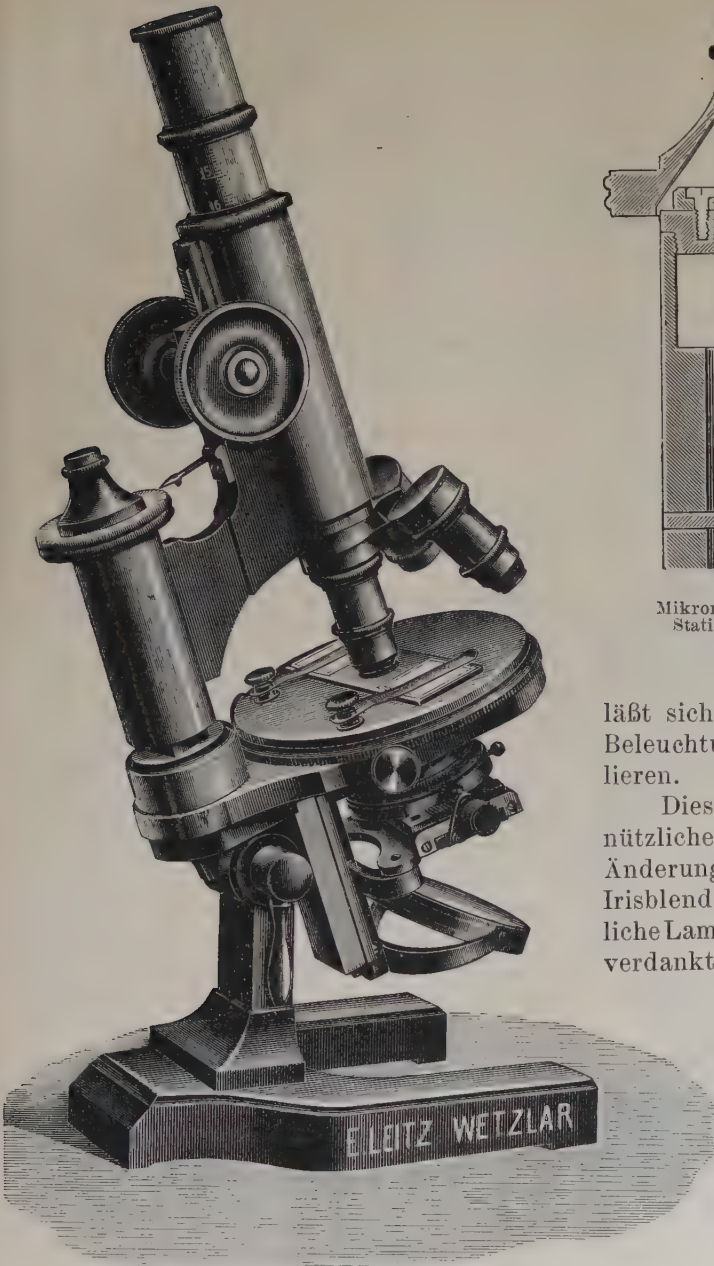
Von **C. Metz**, Wetzlar.

Mit 11 Textabbildungen.

Wir begnügen uns mit der Beschreibung von zwei Mikroskopen, welche die Ausbildung des heutigen Mikroskopstativs in zwei sehr vollendeten und weit verbreiteten Typen zeigen. Das erste ist von *Hartnack*, dem Neffen und Nachfolger *Oberhäuser*, aus dessen oben beschriebenem Instrument weiter ausgebildet worden und hat seine jetzige Gestalt im großen und ganzen in der optischen Werkstätte von *Zeiß* erhalten. Das abgebildete Instrument (s. Fig. 12) ist das Stativ Ia von *Leitz*, durch den es die weiteste Verbreitung fand. Dieses große Instrument besitzt den alten schweren Hufeisenfuß, das Oberteil läßt sich um ein Gelenk bis zur horizontalen Stellung umlegen und kann durch einen Hebel in jeder Stellung festgeklemmt werden. Der runde Tisch ist geräumig genug, um auch große Schalen und Platten aufzunehmen: er ist um die optische Achse drehbar. Durch zwei Schrauben und eine gegenwirkende Feder läßt sich der Tisch zentrieren und zum feineren Durchsuchen des Präparats verwenden. Die Drehung des Objektisches dient hauptsächlich dem Zweck, die Konturen des Objekts unter den verschiedensten Beleuchtungswinkeln zu zeigen. Der Tubus setzt sich aus einem festen und einem ausziehbaren Stück zusammen, letzteres hat Teilung: sie gibt die gesamte Länge des Tubus an von der Augenlinse des Okulars bis zur unteren Ansatzfläche, an die sich das Objektiv unmittelbar oder erst mittels des Revolvers ansetzt. Der Tubusauszug hat erstens den Zweck, durch Verlängerung oder Verkürzung des Tubus die durch abweichende Deckglasdicken entstehenden sphärischen Fehler auszugleichen: weiter dient er dazu, bei mikrometrischen Messungen durch Erreichung bestimmter Vergrößerungen, Erleichterung in der Berechnung zu bieten oder Objekte beim Zeichnen unter einer gewünschten Vergrößerung wiederzugeben.

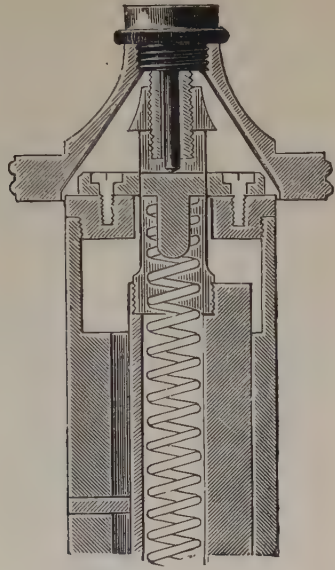
Den Beleuchtungsapparat bildet ein zweilinsiges System von der numerischen Apertur 1.2, oder ein dreilinsiges System von der numerischen Apertur 1.40, oder der chromatisch und aplanatisch korrigierte Kondensor von der numerischen Apertur 1.40. Der Beleuchtungsapparat ist mit Zahn und Trieb versehen, um ihm die gewünschte Einstellung auf das Objekt zu geben. Durch die verstellbare Irisblende

Fig. 12.



Mikroskop I a von Leitz.

Fig. 13.

Mikrometerschraube des
Stativs I a von Leitz.

läßt sich die Öffnung des Beleuchtungskegels regulieren.

Diese wertvolle und nützliche Einrichtung, die Änderung der Öffnung der Irisblende durch bewegliche Lamellen zu bewirken, verdankt man *Collins*, der

sie vor mehr als 50 Jahren in schon sehr brauchbarer Gestalt ausführen ließ. Durch ein Triebwerk läßt sich die Irisblende exzentrisch stel-

len und in dieser Weise schiefe Beleuchtung erzielen. Durch Drehung der Irisblende um die optische Achse läßt sich diese Beleuchtung von

allen Seiten dem Objekt zuführen. Bei schwächeren Vergrößerungen kann man sich mit der Beleuchtung durch Plan- oder Hohlspiegel allein begnügen. Der Kondensor wird dann durch die Zylinderblende ersetzt.

Die grobe Einstellung geschieht durch ein Zahn- und Triebwerk, welches durch die beiden Knöpfe zur Seite des Stativs in Bewegung gesetzt wird. Durch den schiefen Schnitt der Zähne von Triebstange und Triebtrad und die federnde Lagerung der Triebwelle ist der tote Gang, der früher so störend sich geltend machte, vermieden.

Die feine Einstellung geschieht durch eine Mikrometerschraube, welche am oberen Teil der Säule angebracht ist (s. Fig. 13). Auf das Metallprisma des Unterteils des Mikroskops schiebt sich der entsprechend ausgearbeitete prismatische Hohlraum der Säule des Oberteils. Beide Teile gleiten leicht und sicher ohne seitliche Schwankung aufeinander.

Das Prisma ist ausgebohrt und enthält eine Spiralfeder von der Stärke, daß sie das ganze Oberteil des Mikroskops tragen kann. Der obere Teil des Prismas endet in einem zylindrischen Stück, welches geschlitzt und mit einem inneren Gewinde, dem Muttergewinde der Mikrometerschraube, versehen ist. Nachdem die Feder in das Prismeninnere eingelassen ist, wird dasselbe durch eine Brücke, welche durch den Schlitz führt, geschlossen und die Brücke mit dem Oberteil fest verschraubt. Die Feder drückt das Oberteil so weit aufwärts, als es der Schlitz gestattet, etwa 5 mm, der Spielraum der Mikrometerschraube. Der Druck nach abwärts wird durch die Mikrometerschraube bewirkt. Der Gewindezapfen derselben ist ausgebohrt und enthält einen losen Stahlzylinder, dessen Spitze gegen die Brücke drückt. Die Höhe eines Schraubenganges der Mikrometerschraube beträgt 0.5 mm; ein Teilstrich des in 50 Teile geteilten Schraubenkopfes beträgt also $\frac{1}{100}$ mm.

Der Revolver, in der Regel der dreiteilige, ist an diesem, sowie an jedem größeren Instrument zum schnellen Wechseln der Objektive unentbehrlich geworden; den ersten modernen Revolver, eine um eine seitliche schiefe Achse drehbare Scheibe, findet man in der Mitte des vorigen Jahrhunderts von *Nachet* ausgeführt und *revolver porte-objetif* genannt.

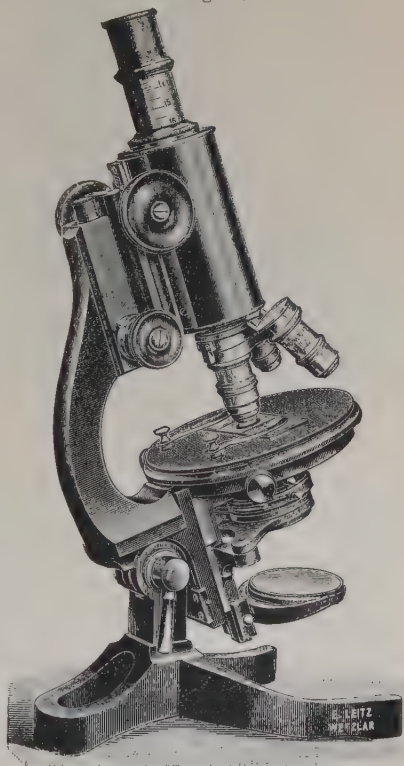
Ausgestattet wird das Stativ in der Regel mit den achromatischen Trockensystemen 2, 4 und 6 und der homogenen Ölimmersion $\frac{1}{12}$, sowie den Okularen I, III, IV und V. Von nachstehenden Tabellen gibt die erste die Brennweiten und numerischen Aperturen der Objektive, die zweite die Eigenvergrößerungen der Objektive und Okulare und ihre Gesamtvergrößerungen. Letztere bei der Tubuslänge von 170 mm und der Bildweite von 250 mm.

Objektive	Brennweite (f_{ob}) mm	Numerische Apertur
2	24	0.21
4	10	0.47
6	4	0.82
Ölimmersion $\frac{1}{12}$	1.8	1.30

Objektive	Eigen- vergrößerung $\frac{\Delta}{f_{ob}}$	O k u l a r e				Eigenvergrößerung $\frac{250}{f_{ok}}$
		I	III	IV	V	
		5	8	10	12	
2	5.8	29	46	58	70	
4	18.2	91	146	182	218	
6	48	240	384	480	576	
Ölimmersion $\frac{1}{12}$	105	525	840	1050	1260	

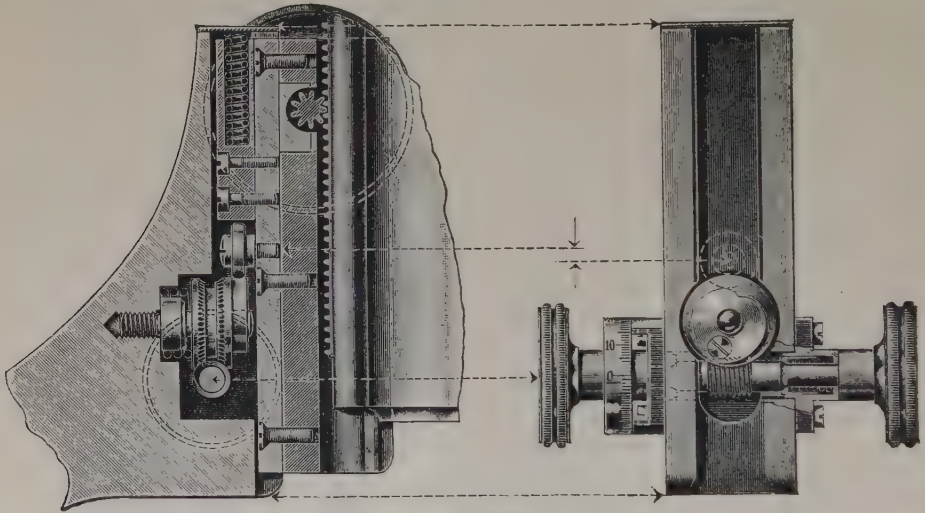
Wir wollen noch zum Schluß das Mikroskop A von *Leitz* (s. Fig. 14) kennen lernen, das die letzte Entwicklungsstufe zeigt, die das Mikroskop in dieser Firma erreicht hat. Dieses Mikroskop kann als ein neuer Typus gelten. Der nüchternen Form des kontinentalen Mikroskops, wie es in der Hauptsache aus der *Hartnack*-schen Werkstätte hervorging, das gekennzeichnet ist durch seinen Hufeisenfuß und gerade Säule, den viereckigen Tisch, die Mikrometerschraube an der Säule, tritt das neue Instrument entgegen. In der runden gefälligen Form des Fußes und der Säule und der Lagerung der Mikrometerschraube nähert es sich dem englischen Stativ. Der kurze Tubus des kontinentalen Instruments ist aber geblieben. Der weit ausgreifende geschmackvolle Dreifuß gibt dem Stativ einen sehr festen Stand, auch dann noch, wenn das Oberteil des Instruments bis zur Horizontalen geneigt ist. Die geschweifte Säule des Oberteils über dem Gelenk bietet nicht nur eine bequeme Handhabe für das Instrument, sondern läßt auch für den Tisch freien Raum zur Durchsichtung großer Schnitte, Platten und Schalen. Der weite Tubus ist gewählt, um bei mikrophotographischen Aufnahmen Weitwinkelobjektive ohne Okular benutzen zu können. Die grobe Einstellung des Instruments, der beweglichen dreh- und zentrierbare Tisch und der Beleuchtungsapparat entsprechen im großen und ganzen denselben Teilen des vorigen Instruments.

Fig. 14.

Mikroskop A von *Leitz*.

Was noch besonders das Instrument auszeichnet, ist die Mikrometerschraube (s. Fig. 15). Sie ist unmittelbar an den Tubus verlegt. Es ruht nicht mehr wie bei der Mikrometerschraube des kontinentalen Mikroskops das Gewicht von Oberteil und Tubus, sondern nur noch das Gewicht des Tubus auf der Feder der Schraube. Es ist dadurch ein feinerer und leichterer Gang als mit der vorigen Schraube zu erzielen. Während man bisher Schraube, Hebel und schiefe Ebene als Bewegungsmechanismen verwandt hat, ist es hier ein um eine Achse rotierendes herzförmiges Stück, welches die Bewegung des Tubus bewirkt. Dieses Stück sitzt auf einem Rad, in dessen Zähne das Gewinde der Triebwelle eingreift. Durch die beiden seitlichen Knöpfe wird die Welle bewegt. Der Druck

Fig. 15.



Mikrometerschraube des Stativs A von Leitz.

einer Feder, der stetig auf die eine Lagerachse ausgeübt wird und die doppelte Zahnung des Rades lassen keinen toten Gang bei der Bewegung aufkommen. Über dem Herzstück läuft eine Rolle, deren Lager mit dem Tubusträger fest verbunden ist. Auf das Lager wirkt eine Feder, die in einem Zylinder an der Säule des Stativs eingelassen ist. Sie drückt einen Stift auf das Lager und sichert durch ihren Druck, der sich noch durch das Gewicht des Tubus erhöht, die stete Verbindung zwischen Rolle und Herzstück. Die Peripherie des letzteren bilden zwei Spiralen. Der Abstand des nächsten und des entferntesten Punktes vom Drehungszentrum differiert um 3 mm. Bei einer halben Umdrehung des Herzstückes vollzieht sich diese Steigung der Spirale, u. zw. um gleiche Beträge bei gleicher Umdrehung. Das Rad hat 30 Zähne. Bei einer Drehung um 15 Zähne ist also eine halbe Umdrehung erfolgt. Die Drehung um einen Zahn bewirkt also eine Bewegung von $\frac{3}{15} = 0.2$ mm. Zur Drehung des Zahnrades um einen Zahn bedarf es einer vollen Um-

drehung der Triebwelle mit ihren Triebknöpfen. Auf dieser Triebwelle sitzt eine Trommel, welche in 100 Teile geteilt ist. Der Drehung der Trommelteilung um einen Teilstrich entspricht also eine mikrometrische Bewegung von 0'002 mm. Durch die Verbindung von zwei Spiralen zu dem herzförmigen Stück sind noch weitere wesentliche Vorteile erreicht. Es ist eine endlose Schraube geschaffen, die nie durch Überdrehung Schaden leiden kann. Abwechselnd findet ein Steigen und Fallen des Tubus in einem Spielraum von 3 mm statt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß ein Zertrümmern des Deckglases, falls es berührt wird, fast ausgeschlossen ist, denn es löst sich die Verbindung zwischen Rolle und Spirale; die Spirale läuft frei und das Objektiv sitzt ohne Schaden mit dem Gewicht des Tubus auf dem Deckglas. Eine der häufigsten Ausstattungen, die das Instrument erhält, ist die mit den Apochromaten 16, 8, 4, Ölimmersion 2 mm und den Kompensationsokularen 4, 6, 8, 12 und 18. Die Tabellen

Objektive	Brennweite (f_{ob}) mm	Numerische Apertur
16	16	0·30
8	8	0·65
4	4	0·95
Ölimmersion 2	2	1·40

Objektive	Eigen- vergrößerung Δ $\frac{250}{f_{ob}}$	Kompensationsokulare					Eigenvergrößerung $\frac{250}{f_{ok}}$
		4	6	8	12	18	
		5·6	8·8	11·1	16·7	25·0	
16 mm	11·5	64	95	128	192	287	
8 "	23·0	129	191	255	384	575	
4 "	46·0	258	382	511	768	1150	
Ölimmersion 2 mm	92·0	515	764	1021	1536	2300	

geben Aufschluß über Brennweiten, numerische Aperturen. Eigenvergrößerungen und Gesamtvergrößerungen von Objektiven und Okularen. Hinsichtlich der Eigenvergrößerung der Objektive und Okulare muß man beachten, daß über die Definition dieser Werte bei den Optikern keine Einheitlichkeit besteht. *Leitz* gibt die rein mathematische Definition. *Zeiß* die auf Grund einer schematischen Zerlegung von Objektiv und Okular sich ergebenden Werte (vgl. auch S. 33).

Die heutigen Objektive.

Wir haben noch einen Blick zu werfen auf die letzten Errungenschaften der mikroskopischen Optik.

Es lassen sich jetzt drei Gattungen von Objektiven unterscheiden:

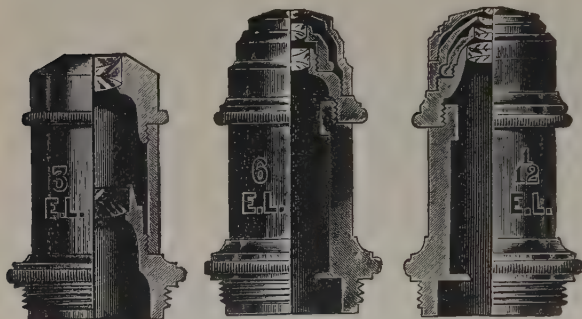
Die Achromate,

die Fluoritsysteme,

die Apochromate.

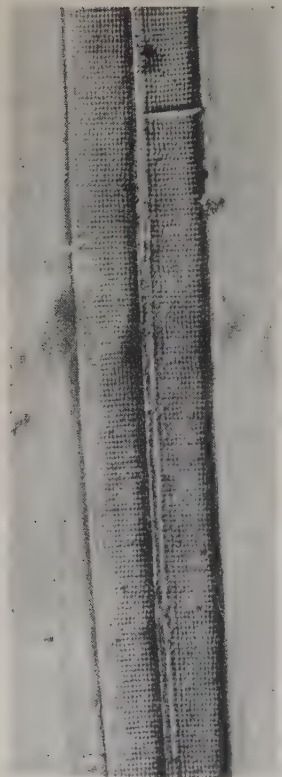
Die Achromate sind noch die am meisten gebrauchten Objektive geblieben. Sie zeigen noch die bewährten Konstruktionstypen (siehe

Fig. 16.



Typen der achromatischen Objektive.

Fig. 17.



Amphipleura pellucida.
Vergrößerung 2000 mal.
Aufgenommen mit Leitz-Apo-
chromat 2 mm; numerische
Apertur 1.40.

Fig. 16), wie sie von *Chevalier, Amici, Oberhäuser, Hartnack, Tolles* u. a. ausgebildet worden sind. Die schwächeren Objektive bestehen meist aus zwei achromatischen Doppel- und wohl auch dreifachen Linsen. Bei den stärkeren Trockenobjektiven tritt eine ein-

fache Linse in der Gestalt einer Halbkugel als Frontlinse hinzu. Diese Fronthalbkugel erfährt bei den Ölimmersionen noch eine Verstärkung durch eine schalenförmige Linse. Durch Einführung optisch günstig liegender Gläser, stärkere Beseitigung der Fehlerreste und Erhöhung der Aperturen haben diese Objektive noch wertvolle Verbesserungen erfahren. Der Histologe zieht vielfach zur Auflösung gewisser gefärbter Präparate mit sehr feiner Körnung die Achromate den Apochromaten vor.

Eine neuere Klasse von Objektiven bilden die Fluoritsysteme. Sie stehen in der Farbenkorrektion zwischen den Achromaten und Apochromaten. Ihre Konstruktion lehnt sich mehr an die Achromate an: durch Aufnahme von Fluorit, wenn auch in beschränkterem Maße als bei den Apochromaten, ist die optische Leistung gegenüber den Achromaten recht deutlich gesteigert. Nur aus dem neuen Glasmaterial allein hat sich bis jetzt in einfacherer Weise noch kein Objektiv konstruieren lassen, welches die Farbenkorrektion der Apochromate erreichen konnte.

Die meist nach den *Abbeschen* typischen Formen neben *Zeiss* auch noch von den übrigen ersten deutschen Firmen, wie *Leitz, Reichert, Seibert* und *Winkel*, ausgeführten apochromatischen Objektive

haben in ihrer feinen Korrektur unterdes noch einen weiteren Ausbau erfahren. Die Haltbarkeit der Objektive hat gewonnen, seitdem man die gegen atmosphärische Einflüsse nicht hinreichend widerstandsfähigen Phosphat- und Boratgläser durch haltbarere Gläser ersetzt hat. Die Apertur des Ölimmersionsobjektives 2 mm hat noch eine Erhöhung erfahren. Dieses mit der hohen Apertur von 1'40 ausgestattete, von *Zeiß*, *Winkel*, *Seibert* und *Leitz* ausgeführte Objektiv kann wohl heute als die hervorragendste Leistung auf diesem Gebiet der Optik gelten: nur erfordert die außerordentlich feine Fassung der Fronthalkugel eine sehr vorsichtige Behandlung des Objektivs, damit diese Halkugel nicht aus ihrer Fassung gedrückt wird. Die mit diesem Objektiv von *Leitz* aufgenommene Schale von *Amphipleura pellucida*, eine Diatomee, die als schwierigstes Testobjekt gilt, zeigt die Zeichnung vollständig gelöst (s. Fig. 17). Die Querstreifen, auf deren Auflösung es besonders ankommt, haben einen Abstand von nur 0.25 μ . Wie auch die Aufnahme erkennen läßt, ist sie ohne stärkere schiefe Beleuchtung zustande gekommen. Man kann also heute mit dem besten Objektiv eine zehnmal feinere Zeichnung erkennen als es mit dem unkorrigierten Objektiv, mit dem sich so lange die Optik behelfen mußte, möglich war.

Die Okulare.

Durch das Okular wird ein vom Objektiv entworfenes vergrößertes Bild des Objekts einer nochmaligen Vergrößerung unterzogen. Da die vom Objektiv aufgenommenen Strahlenbündel sich nach dem Durchgang durch dasselbe in schmale Bündel verwandelt haben und als solche das Okular durchsetzen, können neue sphärische Abweichungen im Okular innerhalb dieser verschwindend dünnen Bündel nicht auftreten. Die Erfüllung einer sphärischen Korrektur kommt für das Okular nicht in Betracht. Es bleiben aber noch andere wesentliche Forderungen übrig, die an das Okular gestellt werden. Es muß erstens die Achromasie der Brennweiten für zwei Farben vorhanden sein, damit gleiche Vergrößerung für diese beiden Farben (rot und blau) erzielt wird. Zweitens muß Wölbung und Verzerrung vermieden werden. Drittens muß sich ein größeres Gesichtsfeld bequem überschauen lassen. Diese Forderungen lassen sich schon erfüllen durch zwei meist plankonvexe Linsen, welche in einem Abstand von einander stehen, welcher der halben Summe ihrer Brennweiten gleich ist. Es gibt zwei Formen von aus zwei einfachen Linsen konstruierten Okularen, bei welchen die angegebene Beziehung zwischen dem Abstand und den Brennweiten der Linsen besteht, das *Ramsdensche* und das *Huyghenssche* Okular. Ersteres kommt für das Mikroskop kaum in Betracht. Letzteres ist bis jetzt am häufigsten am Mikroskop zur Verwendung gekommen. Die beiden plankonvexen Linsen kehren ihre Krümmung dem Objektiv zu. Die untere, nach der Seite des Objektivs sitzende Linse heißt Kollektivlinse, die nach dem

Auge gerichtete, Augenlinse. Die Brennweite der Augenlinse ist etwa halb so groß als die der Kollektivlinse. Eine Blendenebene liegt im Brennpunkt der Augenlinse, zwischen dieser und der Kollektivlinse. Durch die Kollektivlinse werden die divergenten Strahlenbündel in konvergente verwandelt. Durch die Augenlinse wird das von Objektiv und Kollektivlinse in der Blendenebene reell entworfene Bild wie durch eine Lupe betrachtet. Beim *Ramsden*-Okular haben die beiden Linsen fast gleiche Brennweite, die Linsen kehren ihre konvexe Fläche einander zu und die Blendenebene liegt außerhalb der beiden Linsen unter der Kollektivlinse.

Aus letzterem hat sich das orthoskopische Okular nach *Kellner* entwickelt. Die Augenlinse aber ist achromatisiert und Gläser und Radian sind so gewählt, daß ein großes und ebenes Gesichtsfeld zustande kommt; ihm gleicht das periskopische Okular von *Seibert*. Die Kompensationsokulare von *Zeiß* entsprechen in ihren schwächeren Nummern ziemlich dem Typus der *Huyghensschen*, in den stärkeren dem der *Ramsden*-Okulare.

Bei ersteren ist die Augenlinse, bei letzteren die Kollektivlinse derart achromatisiert, daß sie auch die bei den Apochromaten verbleibenden Farbenfehler für außeraxiale Teile des Sehfeldes, die sich in ungleicher Vergrößerung der Bilder verschiedener Farben äußern, aufzuheben vermögen. Die periplanatischen Okulare von *Leitz* sind *Huyghenssche* Okulare mit achromatischen Augenlinsen, die den besondern Zweck verfolgen, das gekrümmte Gesichtsfeld vor allem der schwächeren Apochromate zu ebnen und ein großes brauchbares Gesichtsfeld zu erzielen. Diesen Zweck erreicht *Winkel* in seinen komplanatischen Okularen mit einer dreifachen, verkitteten, der *Steinheilschen* Lupe gleichenden Linsenkombination, *Leitz* durch eine zweifache, verkittete Linse.

Die Kompensationsokulare von *Zeiß*, die komplanatischen von *Winkel* und die periplanatischen und *Huyghensschen* Okulare von *Leitz* besitzen noch die wertvolle Eigenschaft, daß die unteren Brennpunkte sämtlicher Okulare, wenn sie im Tubus eingesteckt sind, in derselben Höhe liegen. Dies hat zur Folge, daß beim Wechsel der Okulare das einmal eingestellte Bild in gleicher Schärfe eingestellt bleibt. Nur zum Ausgleich einer etwa abweichenden Akkommodation der Augen braucht die feine Einstellschraube in Tätigkeit zu treten. Es tritt noch der Vorteil hinzu, daß sich die Trockensysteme am Revolver für alle Okulare so abstimmen lassen, daß nach erfolgter Einstellung eines Objektivs und eines Okulars, Objektive und Okulare sich beliebig wechseln lassen, ohne daß die Einstellung eine nennenswerte Einbuße erleidet.

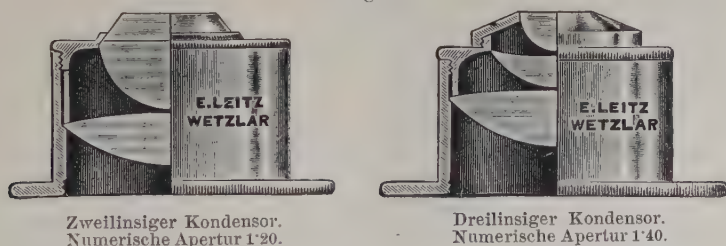
Die Kondensoren.

Wie die Geschichte des Mikroskops gezeigt hat, wandte man schon früher, selbst ehe man sich des Spiegels bediente, Linsen zur Beleuch-

tung an. Solche Beleuchtungsapparate, die ihr Licht von Lampen erhielten, bauten schon *Hooke* und *Bonanni* zu ihren Mikroskopen. Lange begnügte man sich dann später mit dem Planspiegel bei schwächeren, mit dem Hohlspiegel bei stärkeren Vergrößerungen. Einen Fortschritt in der Regulierung der Beleuchtung bildeten die Zylinderblenden, die zuerst *Oberhäuser* bei seinen Mikroskopen einführte. Einer Trichterblende begegneten wir aber schon bei den Mikroskopen von *Cuff* und *Culpeper*. *Amici* verband mit einem Planspiegel eine Sammellinse, welche sowohl in der optischen Achse wie auch seitlich verstellbar war. Der Beleuchtungsapparat, der erst in Theorie und Praxis allen Anforderungen entsprach, war der von *Abbe* 1873 geschaffene Apparat, der als *Abbescher* Beleuchtungsapparat heute an keinem größeren Mikroskop mehr fehlt. *Abbes* Verdienst war es, daß er ein Linsensystem schuf, dessen Öffnungswinkel den Objektiven angepaßt war, daß sich die Öffnung des Lichtkegels durch den Wechsel der Blenden sowohl bei gewöhnlicher Beleuchtung, wie auch bei Dunkelfeld bequem regeln, gerades und schiefes Licht sich in schnellem Wechsel erzielen und dasselbe in wirksamer Höhe auf dem Objekt vereinigen ließ. An die Stelle der auswechselbaren Blendscheiben trat später die so außerordentlich brauchbare Irisblende. Als bequemere Einrichtung als der Kondensor in Schiebehülse, der im Bedarfsfall durch die Zylinderblende ersetzt wird, stellt sich der auszuklappende Kondensor dar; die Irisblende im Tisch tritt in Wirkung, wenn der Kondensor ausgeschaltet ist.

Eine Beschreibung des *Abbeschen* Beleuchtungsapparates ist schon gegeben. Es erübrigt noch, eine Angabe über Bau und Zweck der gebräuchlichen Kondensoren zu machen. Die Kondensoren sind so konstruiert, daß die vom Planspiegel zugeleiteten parallelen Strahlen sich

Fig. 18.



1--2 mm über der Oberfläche der obersten Linse vereinigen, in der Höhe, in der sich das auf dem Objektträger liegende Präparat befindet. Die numerische Apertur sämtlicher Kondensoren ist, solange sie trocken gebraucht werden, gleich, und beträgt 1.0. Ihre höhere Apertur kommt erst zur Geltung, wenn sie als Immersionskondensoren gebraucht werden, d. h. wenn zwischen Kondensor und Objektträger als Medium Wasser und Öl tritt. Diese höhere Apertur wird im Präparat wirksam, wenn dasselbe in Flüssigkeit eingebettet oder mit dem Glas verkittet ist.

Den gebräuchlichsten Kondensor (s. Fig. 18) bilden zwei einfache Linsen, eine bikonvexe und eine Halbkugel, wie ihn schon *Abbe* vorgesehen hatte. Seine numerische Apertur beträgt $1:20$. Zur Erzielung eines Dunkelfeldes bei schwacher Vergrößerung ist dieser Kondensor allein geeignet, während zu dieser Beleuchtung bei starker Vergrößerung der dreigliedrige und der aplanatische Kondensor allein mit Vorteil zu benutzen sind.

Die meisten Optiker stellen in der Regel noch einen zweiten Kondensor mit der höheren Apertur von $1:40$ her (s. Fig. 18). Er ist zusammengesetzt aus einer bikonvexen Linse, einem Meniscus und einer Halbkugel. Seine höhere Apertur macht sich dann geltend, wenn es sich darum handelt, Lichtkegel von hoher Apertur oder stärkere schiefe Beleuchtung zur Anwendung zu bringen.

Achromatische Kondensoren bestehen gewöhnlich aus zwei verkitteten Doppellinsen und einer Halbkugel. Sie werden in der Mikrophotographie benutzt, wenn man Wert darauf legt, ein farbenreines Bild der Lichtquelle in der Objektebene zu entwerfen. Ein auch sphärisch korrigierter achromatischer Kondensor, den *Leitz* konstruiert hat (s. Fig 19), besitzt eine numerische Apertur von $1:40$. Die fast punktförmige Strahlenvereinigung, die Freiheit von Farben machen diesen Kondensor noch besonders brauchbar bei der Dunkelfeldbeleuchtung. *Leitz* hat die mit diesem Kondensor verbundene Irisblende mit einer Teilung versehen, so daß man die jeder Öffnung



der Irisblende entsprechende numerische Apertur ablesen kann. Aus der Größe des Bildes der Irisblende, welches in dem hinteren Brennpunkt des Objektivs erscheint, läßt sich aber auch die Apertur jedes Objektivs bestimmen. Diese Einrichtung macht den Kondensor zu einem brauchbaren Apertometer.

Der Strahlengang.

Die Verfolgung der Strahlenbündel im Mikroskop gibt Aufschluß über die Leistung des Objektivs und Okulars, ihre Vergrößerung, über die Lage von Objekt- und Bildebenen, Blenden und Brennebenen und die Bedeutung und Lage der Pupillen.

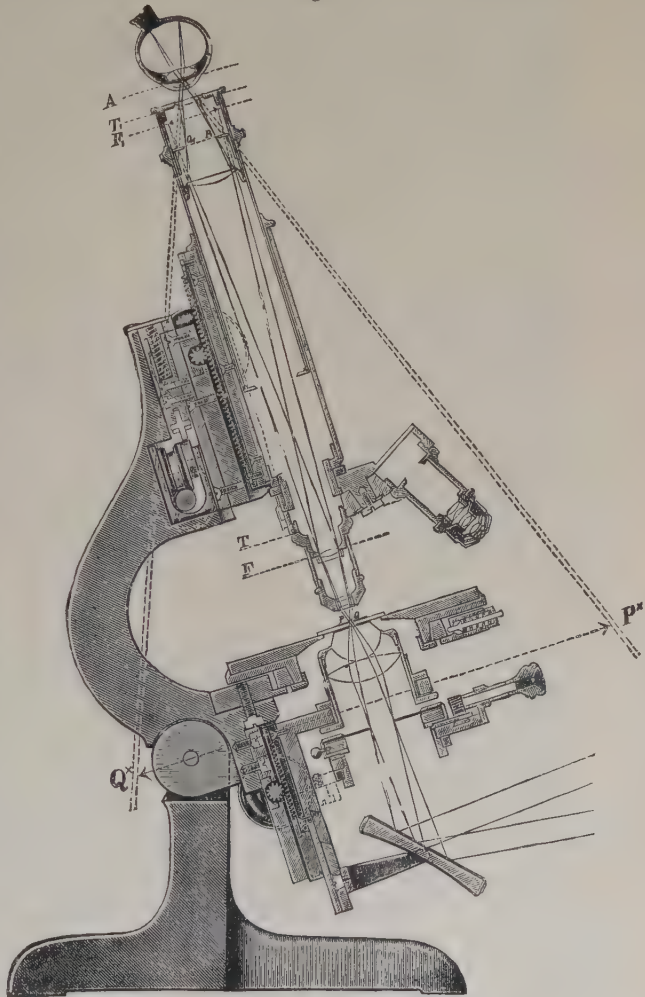
Die Verfolgung zweier Bündel und in ihnen die der beiden Grenzstrahlen, welche in dem durch die optische Achse gelegten Schnitt verlaufen, genügt, uns diesen Einblick in die Optik des Mikroskops zu gewähren (s. Fig. 20). Die Bündel gehen aus von den Objektpunkten *P* und *Q* an der Grenze des Gesichtsfeldes. Die Basis der von den Punkten *P* und *Q* ausgehenden Bündel füllt die Hinterlinse des Objektivs aus; von der Öffnung dieser Bündel hängt die Auflösung und Helligkeit des Objektivs

ab. In dem Unterschied in der Größe dieser Öffnungswinkel zeigt sich vor allem der Fortschritt in der Leistung des heutigen Mikroskops gegenüber dem früheren noch nicht achromatisierten Mikroskop, dessen Strahlengang wir (s. Gesch. des Mikroskops, Fig. 8) schon dargestellt haben.

Nach dem Austritt aus dem Objektiv werden diese Bündel schmal, ihre Öffnung also im Gegensatz zu den Bündeln vor dem Objektiv, sehr gering. Sie durchstoßen die Kollektivlinse des Okulars nur an einem kleinen Flächenstück; sphärische Abweichungen treten in diesem Bereich nicht auf. Es gestaltet sich die Konstruktion der Okulare gegenüber derjenigen der Objektive unverhältnismäßig einfach, weil sphärische Abweichungen im Okular nicht mehr zu heben sind. Die Bündel selbst divergieren gegen die Achse und werden durch die Kollektivlinse derselben zugelenkt. Ohne Zwischentreten der Kollektivlinse wäre das Bild des Objekts in F_1 entworfen worden.

Durch Einführung der Kollektivlinse entsteht aber ein reelles Bild $P_1 Q_1$ in der Blenden-ebene des Okulars; es ist etwas kleiner, als das in F_1 von dem Objektiv allein entworfene Bild. Das Objekt PQ und Bild $P_1 Q_1$ haben umgekehrte Lage. Das reelle Bild $P_1 Q_1$ wird durch die Augenlinse wie durch eine Lupe betrachtet; das von ihr entworfene Bild ist virtuell und liegt 250 mm vor der Linse, dort wenigstens scheint das Bild zu liegen. Auf der Netzhaut des Auges selbst kommt aber ein reelles Bild zustande. Die Strahlenbündel kreuzen

Fig. 20.



Strahlengang im Mikroskop.

sich in der Ebene A , dem Augenort, und bilden hier den *Ramsdenschen* Kreis; bringt man einen Karton über die Augenlinse, so verrät ein heller, kleiner Kreis die Lage der Ebene A . Die Objektpunkte P und Q werden von je einem, von Spiegel und Kondensor gelieferten Lichtbündel beleuchtet. Es sind solche Bündel gewählt, welche von einem entfernt leuchtenden Körper, etwa einer hellen Wolke, aufgefangen werden. Diese Bündel, deren Strahlen unter sich parallel verlaufen, kreuzen sich in der Ebene der Irisblende. Sie fällt möglichst zusammen mit der unteren Brennebene des Kondensors. Die Irisblende fällt somit mit der Eintrittspupille des Gesamtsystems zusammen und kommt in der hinteren Brennebene des Objektivs zur Abbildung. Für die Begrenzung der Strahlenkegel des Kondensors, des Objektivs und Okulars sind drei Ebenen von großer Wichtigkeit, u. zw. die der Irisblende, die des hinteren Brennpunktes des Objektivs F_1 , und die des hinteren Brennpunktes des Okulars A . Die Öffnungen der Strahlenkegel dieser Ebenen heißen die Pupillen. Die Öffnung der Irisblende in der unteren Brennpunktsebene des Kondensors, in der die erste Kreuzung der Strahlenkegel stattfindet, heißt die Eintrittspupille des Gesamtsystems. Im hinteren Brennpunkt des Objektivs liegt die Austrittspupille des Objektivs, u. zw. wird sie in der Regel von dem Rande der Fassung gebildet, und im hinteren Brennpunkt des Okulars die Austrittspupille des gesamten Mikroskops. In den hinteren Pupillenorten zeigen sich Bilder der physischen Eintrittsblende, also der Irisblende des Kondensors.

Man erkennt die Pupille im hinteren Brennpunkt des Objektivs, wenn man, nachdem das Objektiv eingestellt ist, das Okular entfernt, auf der hinteren Linse des Objektivs. Man sieht hier das Bild der Irisblende, wenn sie entsprechend zugezogen ist. Die Austrittspupille des Gesamtmikroskops wird in der Höhe des Augenorts sichtbar, wenn man mit einer Lupe auf den *Ramsdenschen* Kreis einstellt; auch hier tritt wieder ein Bild der Irisblende auf. Mit der Irisblende regulieren sich auch diese Pupillen. Durch die Irisblende des Kondensors werden aber nur die Strahlen im Objektiv abgeblendet, welche die Fortsetzungen der beleuchtenden Strahlen des Kondensors bilden; die Strahlen, welche auch die Abbildung zeigt, nicht aber die Strahlen, welche von P und Q als selbstleuchtenden Punkten nach allen Seiten ausgehen; es sind dies die gebeugten Strahlen. Für diese kommt die volle Apertur des Objektivs zur Ausnutzung, wenn auch der Kondensor nicht mit dieser vollen Apertur arbeitet.

Nur eine physische Blende in F kann auch diese gebeugten Strahlen aus dem Strahlenbündel ausscheiden und die Apertur auch für sie beschränken: das Bedürfnis hierfür liegt wohl kaum vor. Es gilt vielmehr, durch die Irisblende des Kondensors die Öffnung der direkten Strahlen für jedes Präparat so zu wählen, daß ihre Apertur für die Auflösung des Objekts im günstigsten Verhältnis steht zu den das Objektiv voll ausfüllenden gebeugten Strahlen.

Von besonderer Bedeutung sind noch im Strahlengang die beiden Ebenen PQ und P_1Q_1 , die des Objekts und Bildes. P und Q , P_1 und Q_1 sind Schnittpunkte von Strahlenbündeln. Blenden in diesen Ebenen bleiben vollständig wirkungslos für die Regulierung der Beleuchtung, sie dienen hier zur Begrenzung des Objekt- und Bildfeldes. Für die Praxis in Betracht kommt zur Abblendung dieser Ebenen nur die Blende in der Bildebene P_1Q_1 . Ebenso wenig wie man ein Objekt direkt mißt durch einen in der Objektebene angebrachten Maßstab, ebenso wenig begrenzt man es auch hier durch eine Blende. Die Zylinder- und Irisblende in der Höhe der Oberfläche des Tisches dienen in der Regel nur zur Beseitigung von Reflexen außerhalb des Sehfeldes.

Die Entfernung zwischen der hinteren Brennebene des Objektivs und der vorderen Brennebene des Okulars FF_1 bezeichnet man als optische Tubuslänge $= \Delta$.

Die Größe der optischen Tubuslänge ist sehr verschieden; bei stärkeren Objektiven ist sie am größten und beträgt etwa 190 mm bei einem Tubusauszug von 170 mm, bei den schwächsten Objektiven, wie sie am Mikroskop noch zur Verwendung kommen, kann sie weit unter 100 mm sinken.

Nach einem Kardinalsatz der Optik berechnet sich die Vergrößerung eines Objektivs als Quotient aus Bildweite durch Brennweite, ein Ausdruck, wie er bei der Projektion von Bildern jedem wohlbekannt ist. Diese Bildweite muß in der Mikroskopie noch schärfer definiert werden als Abstand des Bildes von der hinteren Brennebene des Objektivs. Die Bildgröße in der unteren Brennebene des Okulars im Abstand Δ vom hinteren Brennpunkt des Objektivs beträgt $\frac{\Delta}{f_1}$, wenn f_1 die Brennweite des Objektivs bezeichnet; aus diesem Ausdruck ergibt sich die Eigenvergrößerung des Objektivs. Dieses Bild wird nochmals vom Okular vergrößert und kommt scheinbar in der Entfernung von 250 mm vom Auge zustande. In der Augenhöhe liegt aber der hintere Brennpunkt des Okulars, es ist also die durch das Okular erzeugte Vergrößerung, die Eigenvergrößerung des Okulars, $\frac{250}{f_2}$, f_2 ist die Brennweite des Okulars. Die Gesamtvergrößerung des Mikroskops (V) wird gebildet durch das Produkt $V = \frac{\Delta}{f_1} \times \frac{250}{f_2}$.

Durch das Objektiv ist vom Objekt ein umgekehrtes Bild entworfen worden, wie die umgekehrte Lage von PQ und P_1Q_1 zeigt. Da das Okular ähnlich einer Lupe wirkt, so gibt sie ein vergrößertes Bild in derselben Lage von $P_1Q_1 = P^\times Q^\times$. $P^\times Q^\times$ zeigt sich also auch in umgekehrter Lage zum Objekt.

Allgemeine Bemerkungen und Anweisungen.

Okulare und Objektive müssen zuweilen gereinigt werden. Die Augen- und Kollektivlinsen der Okulare lassen sich einzeln abschrauben

und somit gründlich reinigen. Das Objektiv prüft man am besten mit der Lupe. Die Reinigung der bestaubten und sonst beschmutzten vorderen und hinteren Flächen kann jeder leicht selbst vornehmen.

Die inneren Flächen können nicht leicht beschmutzt werden; doch zeigen ältere Objektive zuweilen Trübungen, welche sich auf Gläsern einstellen, die noch nicht hinreichend auf ihre Haltbarkeit erprobt waren. Die gründliche Beseitigung dieser neuerdings immer seltener auftretenden Mängel muß dem Optiker überlassen bleiben. Staub entfernt man mit einem feinen Haarpinsel. Beschmutzungen werden mit einem mit Wasser oder Alkohol befeuchteten Leinwandläppchen beseitigt. Die Köpfe der Objektive sind vernickelt und vertragen eine Behandlung mit Spiritus; nicht aber der lackierte Teil der Objektive. Chemikalien vertragen weder die Fassung noch die Gläser der Objektive. Auch das Stativ bedarf steter Reinigung; der Hartgummitisch kann, falls er mit Öl beschmutzt ist, mit einem Spiritusläppchen abgeputzt werden; man hüte sich aber, Spiritus mit den lackierten Teilen des Stativs in Berührung zu bringen; trockene Leinwand oder Rehlleder reichen zur Reinigung dieser Teile aus. Da die Objektive auf eine bestimmte Tubuslänge, welche nicht bei allen Optikern die gleiche ist, justiert sind, so muß man den Auszug so stellen, daß die geforderte Tubuslänge eingehalten wird. Abweichungen von dieser Tubuslänge machen sich besonders bei starken Objektiven durch die Abnahme ihres Auflösungsvermögens bemerkbar. Vor allem bei Ölimmersionen mit ihren hohen Aperturen ist auf die genaue Einhaltung der Tubuslänge zu achten. Sollen stärkere Objektive in ihrer Leistung voll ausgenutzt werden, so muß man genau die Deckglasdicke einhalten, welche der Optiker vorgesehen hat. Heute sind Deckgläser von der Dicke, welche die Optiker für ihre Objektive vorschreiben, leicht zu beschaffen. Falls man abweichende Deckgläser nicht umgehen kann, läßt sich ein Ausgleich schaffen durch die Verlängerung des Tubus bei zu dünnen und Verkürzung des Tubus bei zu dicken Deckgläsern. Ein zweites Mittel, die Objektive für die verschiedenen Deckglasdicken brauchbar zu machen, bietet eine Korrektionsfassung. Durch die Verschiebung der hinteren Linsen gegen die vorderen wird ein Ausgleich für Korrektion der verschiedenen Deckglasdicken hergestellt. Durch einen Index auf der Fassung des Objektivs wird den Linsen die Stellung gegeben, welche die betreffende Deckglasdicke verlangt.

Ein Vorteil der Ölimmersionen besteht darin, daß ihre Leistung bei Abweichungen in der Dicke der Deckgläser nicht beeinträchtigt wird, weil Öl und Deckglas gleiche Brechungen aufweisen, d. h. homogen sind.

Die Überlegenheit der Immersionsobjektive.

(Elementare Erläuterung.)

Im folgenden wollen wir die jedem Mikroskopiker so stark in die Augen springende Überlegenheit der Immersionsobjektive, besonders

Fig. 21 zeigt, wie bei drei ziemlich gleich starken Objektiven, einem Trockensystem, einer Wasserimmersion und einer Öl-

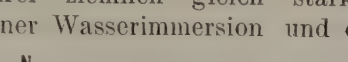


Fig. 21.

Fig. 21.

Optische Achse

Frontlinse

Medien

Deckglas $n=1,52$

Luft $n=1,0$
Wasser $n=1,33$
Petroleumöl $n=1,52$

$\alpha=60^\circ$
 $\beta=80^\circ$
 $\gamma=60^\circ$

E. Leitz, Wetzlar. M.

3*

winkel wird erweitert, d. h. die totale Reflexion abgehalten, durch Einführung der verschiedenen Immersionsflüssigkeiten. Diese Winkel im Deckglas könnte man als die wirksamen Öffnungswinkel bezeichnen. Das Maximum dieser wirksamen Winkel, das gegeben ist durch die totale Reflexion bei Luft, Wasser oder Öl, beträgt bei Luft 82° , bei Wasser 122° und bei Öl 180° .

Messung und Zeichnung mit beiden Augen.

Für den Mikroskopiker dürfte es manchen Nutzen haben, sich mit einer einfachen Methode, die Gesamtvergrößerung des Mikroskops zu bestimmen, vertraut zu machen. Sie gibt ihm zugleich die Möglichkeit, die Bildgröße zu bestimmen und das Bild mit einiger Sicherheit nachzuzeichnen. Beobachtet man mit einem Auge das Bild im Mikroskop und blickt mit dem andern Auge auf ein zur Seite des Mikroskops liegendes weißes Blatt, so erscheint das vom Mikroskop entworfene Bild auf diesem weißen Blatt. Es wird diese Erscheinung durch das sog. Doppelsehen hervorgerufen, das darauf beruht, daß ein von dem einen Auge empfangenes Bild durch das Nervenzentrum auch im andern Auge empfunden wird. Ähnlich, wie bei dem Zeichenapparat in einem Auge, kommt hier in beiden Augen das mikroskopische Bild und das der Zeichenfläche zur Abbildung und gegenseitigen Deckung. Bringt man einen mikroskopischen Maßstab, das Objektmikrometer, unter das Mikroskop, so läßt sich sein Bild auf dem weißen Blatt mittels Zirkels abgreifen. Hat z. B. 1 mm des Maßstabes im Bilde eine Größe von 100 mm in der Entfernung von 250 mm, so hat man eine Vergrößerung von 100. Ist die Vergrößerung bekannt, so läßt sich die Größe des Gegenstandes bestimmen, wenn man die Größe seines Bildes, die man auf dem weißen Papier abgreifen kann, durch die Vergrößerungszahl des angewandten Systems von Objektiv und Okular dividiert. Ist z. B. ein Bacillus im Bilde 4 mm lang, u. zw. bei 1000facher Vergrößerung, so beträgt seine Länge $\frac{4}{1000} = 4 \mu$. Durch diese Methode der Beobachtung läßt sich auch ein auf ein weißes Papier projiziertes Bild nachzeichnen. Dieses Verfahren steht dem Verfahren mittels Zeichenapparates nur darin nach, daß die beiden Bilder, die des Objekts und der Zeichenfläche, bei unruhigem Verhalten der Augenachsen gegeneinander sich etwas verschieben können.

Die binokularen Mikroskope.

Wie beim Fernrohr, machte sich auch beim Mikroskop schon früh das Bestreben geltend, das Instrument für binokularen Gebrauch einzurichten. Unter die ersten Mikroskope dieser Art zählt das von *Chérubin*

d'Orléans, 1678; zwei geneigte Tuben, deren jeder ein vollständiges Mikroskop bildet, sind auf ein Objekt gerichtet. Seit Mitte des vorigen Jahrhunderts begann man binokulare Mikroskope zu bauen, bei denen das von einem Objektiv ausgehende Strahlenbündel durch geeignete optische Mittel entweder mittels Brechung oder Reflexion geteilt und zwei Tuben zugelenkt wurde. So verwandte der Nordamerikaner *Riddell* reflektierende Prismen, der Engländer *Wenham* einen Prismensatz, an dem durch Brechung die Teilung zustande kam. Diese Instrumente blieben nur auf die Amateurkreise Englands und Amerikas beschränkt. Verlegte man die Trennung der Strahlen vom Objektiv weg in die Höhe des Okulars, so ergab sich ein binokulares Okular, wie solche *Tolles* (1864) und *Hartnack* herstellten. Eine weitere Ausbildung erhielt dieses Okular durch *Abbe* (1880).

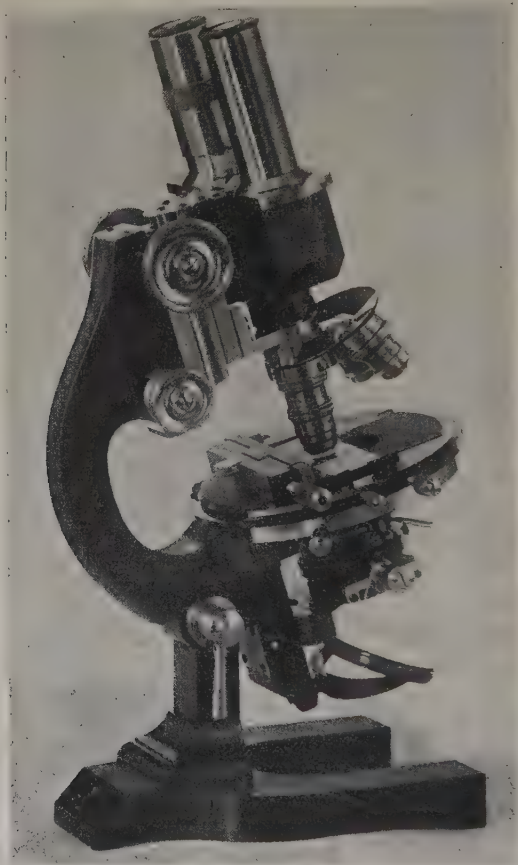
Das stereoskopische Mikroskop nach *Greenough*.

Das binokulare, mit zwei vollständigen Tuben ausgestattete Instrument fand erst in dem 1897 von *Zeiß* gebauten binokularen stereoskopischen Mikroskop nach *Greenough* eine Ausbildung, in der es in mannigfacher Ausgestaltung der wissenschaftlichen Forschung wertvolle Dienste leisten sollte. Die Anregung zum Bau dieses Mikroskops gab der Amerikaner *Horatio S. Greenough*, dessen Namen es auch heute noch trägt. Da der Annäherung beider Objektive an das Objekt bestimmte Grenzen gezogen sind, so bleibt das Instrument auf die Anwendung schwächerer Vergrößerungen beschränkt, die sich etwas durch den besonders schmalen Bau der Objektive steigern lassen. Neben der vorzüglichen deutschen optischen und mechanischen Arbeit, die zum erstenmal einem solchen Instrument zugute kam, war es besonders, was dem Mikroskop den durchschlagenden Erfolg sicherte, die Bildaufrichtung mittels der *Porroschen* Prismen, die seit 1893 zur Herstellung von Prismenfeldstechern bei *Zeiß* Verwendung gefunden hatten. Diese Prismen gestatteten außerdem noch eine stärkere Verkürzung des Tubus und eine bequeme Einstellung des Augenabstandes, der ohne Veränderung der Bildeinstellung sich vollzieht. Kurze Tubuslänge und Bildaufrichtung empfahlen das Instrument vor allem als Präpariermikroskop, zu dem es auch in erster Linie bestimmt war.

Das Mikroskop hat folgende Einrichtung: Auf einem Dreifuß, der den Tisch trägt, läßt sich der obere Teil des Mikroskops mittels zweier Schrauben befestigen. Die Verschraubung bietet die Möglichkeit, das Mikroskop auch auf einem flachen Hufeisenfuß anzubringen und es mit demselben unmittelbar auf den zu beobachtenden Gegenstand aufzusetzen. Zur Beleuchtung genügen der Plan- und Hohlspiegel. Zur Einstellung dient die bekannte Zahn- und Triebbewegung. Die Prismentrommeln, auf denen die Okulartuben sitzen, schwingen um die Achse der Objektivtuben. Diese Bewegung dient zur Einstellung auf

den Pupillenabstand des Beobachters. Die Objektive sind zu Paaren auf Schlitten montiert und lassen sich mit einer Einrichtung nach Art der

Fig. 22.



Objektivwechsler am Tubusende befestigen. Das Instrument ist mit 5 Objektiv- und 7 Okularpaaren ausgestattet und gibt eine 8—200fache Vergrößerung.

Das binokulare Mikroskop von *Leitz*.

Das Instrument (s. Fig. 22) hat, nachdem es eine Reihe von Entwicklungsstufen durchlaufen hatte, seine letzte Ausbildung durch den wissenschaftlichen Mitarbeiter der Firma Leitz, Dr. *Jentzsch*, erhalten, der auch die leitenden Gesichtspunkte, welche der Konstruktion zugrunde lagen, ausführlich in der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie (Bd. XXX, 1913, S. 299 ff.) dargelegt hat. Wie es *Zeiß* mit dem

binokularen bildaufrichtenden Mikroskop, so gelang es *Leitz* mit diesem zweiten Typus des binokularen Mikroskops ein Instrument zu schaffen, das erst in dieser Gestalt den Gelehrten wertvolle Dienste zu leisten vermochte. Da die Teilung der Lichtbündel erst nach dem Durchgang durch das Objektiv stattfindet und diese Teilung in gleich vollendeter Weise bei jedem Objektiv vor sich geht, so können alle Objektive am Mikroskop Verwendung finden. Die Teilung der Lichtbündel vollzieht sich so, daß für jedes Bild derselbe hohe Betrag der Apertur, welche das Objektiv besitzt, zur Geltung kommt. Die Teilung der Strahlen geschieht an der halb versilberten, unter 45° geneigten Fläche des mittleren verkitteten Doppelprismas. Beide Bilder besitzen gleiche Helligkeit. Die Okulartuben sind parallel zur optischen Achse gerichtet und symmetrisch zur Mittelachse des Mikroskops gestellt. Sie lassen sich durch eine Triebvorrichtung parallel verschieben und auf den Pupillenabstand einstellen. Akkommodationsunterschiede der beiden Augen werden durch die Einstellvorrichtung an einem Okular ausgeglichen. Die parallele Richtung der Tuben bildet ein charakteristisches Merkmal, welches das binokulare Mikroskop von *Leitz* von den bisherigen unterscheidet. Sie ermöglicht erst die bei der Beobachtung am Mikroskop geforderte Einstellung beider Augen auf parallel austretende Strahlenbündel, die eine Lage des Bildes im Unendlichen voraussetzen. Nur durch diese parallele Stellung der optischen Achsen der Okulare können beide Augen sich zugleich auf Unendlich akkommodieren, während bei geneigten Tuben die Augen gezwungen sind, sich auf ein Bild in der Entfernung des Kreuzungspunktes der geneigten Achsen einzustellen. Durch diese dem natürlichen Gebrauch der Augen angepaßte Entspannung ist die Bedingung gegeben, unter der erst ein längeres Arbeiten am binokularen Mikroskop ohne Ermüdung gesichert ist. Eine Erscheinung, die bei der gleichen Helligkeit der beiden Bilder dieses Mikroskops noch besonders wohl zu erkennen ist, ist die Summierung der Lichtwirkung, welche durch die auf beide Augen zugleich kommenden Bilder bewirkt wird. Sie bildet einen Ausgleich für den infolge der Teilung der Lichtbündel bewirkten Lichtverlust der Einzelbilder. Die Plastik der Bilder macht sich bis zu den stärksten Vergrößerungen geltend. Sie unterscheidet sich, soweit dies der Vergleich bei schwächeren Vergrößerungen gestattet, nicht von der, welche die von zwei Objektiven hervorgebrachten Bilder gewähren. Die hierdurch erzielte Tiefenwirkung bietet einen Einblick in die Schichtung des Präparates, aus der die Forschung noch reichlichen Gewinn zu ziehen vermag. Hinsichtlich des Baues unterscheidet sich das binokulare Mikroskop außer dem Doppeltubus nur unwesentlich von dem oben (S. 23) beschriebenen großen Mikroskop von *Leitz*. Eine Ausführungsart des Instrumentes gestattet in einfacher Weise den Doppeltubus gegen den einfachen auszuwechseln, den man auch ferner nicht entbehren kann, wenn man das Mikroskop in der Mikrophotographie und Projektion oder zu Beobachtungen im polarisierten Licht benutzen will.

Literatur umfaßt die Geschichte und Entwicklung des Mikroskops bis zur Gegenwart: *Ernst Abbe*, Gesammelte Abhandlungen. I, 1904. — *St. v. Apathy*, Die Mikrotechnik, I. Abt., 1896; II. Abt., 1901. — *Carpenter and Dallinger*, The Microscope and its revelations. 1901. — *Ch. Chevalier*, Des Microscopes. 1839. — *L. Dippel*, Das Mikroskop. 1882. — *P. Harting*, Geschichte des Mikroskops. Deutsche Ausgabe von F. W. Theile. 1866. — *H. van Heurck*, The Microscope. 1893. — *Hugo v. Mohl*, Mikrographie. 1846. — *Nägeli u. Schwendener*, Das Mikroskop. 1867. — *R. J. Petri*, Das Mikroskop von seinen Anfängen bis zur jetzigen Vervollkommnung. 1896. — *J. Quekett*, Treatise on the use of the microscope. 1852. — *M. v. Rohr*, Die binokularen Instrumente. 1920. — *Edm. J. Spitta*, Microscopy. 1907. — J. of the Royal Microscopical Soc. 1878—1920. — Zt. f. Instrumentenk. 1881—1920, I—XL. — Zt. f. wiss. Mikrosk. 1884—1920, I—XXXVII.

Nebenapparate des Mikroskops.

Von **C. Metz**, Wetzlar.

Mit 10 Textabbildungen.

Die Mikrometer.

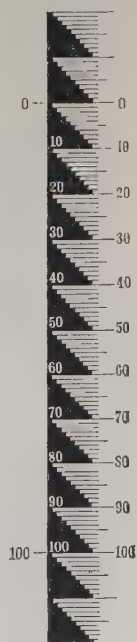
Der Gebrauch der Mikrometer bei Fernrohren übertrug sich schon um die Mitte des 17. Jahrhunderts auf das Mikroskop. *Hertel* benutzte 1716 zu Messungen die Ganghöhe einer im Gesichtsfeld des Okulars angebrachten Schraube oder die Abstände der Fäden eines Netzes. Die ersten Glasmikrometer, die seitdem im Gebrauch geblieben sind, verfertigte *Martin* 1739.

Über die heutigen mikrometrischen Apparate und Meßverfahren ist folgendes zu sagen:

Man mißt Längen von Gegenständen unter dem Mikroskop nicht durch direkten Vergleich mit einem Objektmikrometer, das man zugleich mit dem Gegenstand im objektiven Sehfeld sichtbar macht, sondern bedient sich hierzu des Okularmikrometers. Objekt- und Okularmikrometer sind feine, meist auf Glas photographierte Maßstäbe; das Objektmikrometer ist in der Regel ein in $\frac{1}{100}$ mm und das Okularmikrometer ein in $\frac{1}{10}$ mm geteilter Maßstab. Man stellt das Mikroskop bei einer bestimmten Tubuslänge auf einen Objektmikrometer ein, das Bild desselben kommt zugleich mit dem in der Blende des Okulars liegenden Okularmikrometer zur Erscheinung. Hierdurch wird bestimmt, welcher Länge in der Objektebene ein Teilstrich des Okularmikrometers entspricht; diese Zahl nennt man den Mikrometerwert. Dieser Mikrometerwert beträgt z. B. bei *Leitz*-Objektiv 3 mit Mikrometerokular II und bei 170 mm Tubuslänge 17 μ bei Objektiv 6 3·7 μ und bei Objektiv $\frac{1}{12}$ 1·7 μ . Diese Zahl läßt sich, wenn es auf feine Messungen ankommt, noch genauer bestimmen. Mit diesem Mikrometerwert ist die Zahl der Intervalle, welche der Gegenstand deckt, zu multiplizieren.

Fig. 28.

Ernst Leitz
Wetzlar.



Das Stufen-
mikrometer
von Leitz.

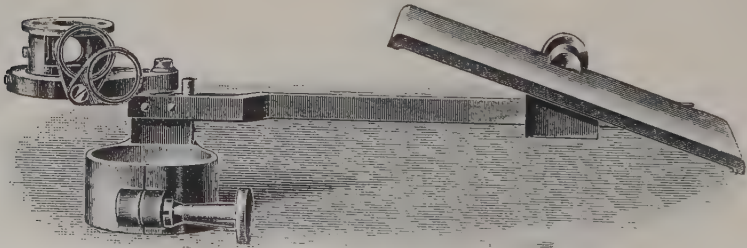
Diese umständliche Multiplikation hat *Zeiß* durch sein Meßokular, das in Verbindung mit den Apochromaten gebraucht wird, *Leitz* durch sein Stufenmikrometer, das sich für alle Objektive verwenden läßt, vermieden (s. Fig. 23). Die Intervalle sind so gewählt, daß sich runde Mikrometerwerte ergeben, die sich noch durch den Auszug genau justieren lassen. Das Stufenmikrometer von *Leitz* ist auch zugleich Kontrastmikrometer; es hebt sich bei jeder Beleuchtung deutlicher vom Bilde ab, als es das gebräuchliche Okularmikrometer vermag.

Zu feinsten Messungen dient das Okular-Schraubenmikrometer. Die Messung geschieht durch eine in der Blendenebene des Okulars erscheinende und durch eine Schraube verschiebbare Strichmarke. Die Bewegung der Marke bewirkt eine Schraube mit bekannter Ganghöhe. Mit der Schraubenwelle ist eine Trommel mit Teilung verbunden, durch deren Intervalle die Verschiebung der Marke und die Größe des im Bild gemessenen Objekts ermittelt werden. Zur genauen Ausmessung der Intervalle dient wieder das Objektmikrometer.

Die Zeichenapparate.

Als einer der gebräuchlichsten Nebenapparate des Mikroskops kann der Zeichenapparat gelten. Seit *Wollaston* 1807 seinen ersten Zeichenapparat schuf, lassen sich mehr als ein Dutzend solcher aufführen. Was

Fig. 24.



Zeichenapparat nach Abbe.

die Apparate im einzelnen unterscheidet, ist die Einrichtung, welche getroffen ist, um die von der Zeichenfläche kommenden Strahlen, welche meist vorher schon eine Brechung erfahren haben und die vom Mikroskop austretenden Strahlen zugleich parallel ins Auge gelangen zu lassen. Spiegel und Prisma sind die Hilfsmittel, deren der Optiker sich zu diesem Zwecke bedient.

Zu den früheren gebräuchlichsten Zeichenapparaten sind der *Sömmeringsche* Spiegel und der *Oberhäusersche* Zeichenapparat zu rechnen.

Heute dürften wohl der Zeichenapparat nach *Abbe* und die Zeichenokulare von *Leitz* als die gebräuchlichsten Apparate gelten. Der Zeichenapparat nach *Abbe* (s. Fig. 24) besitzt folgende Einrichtung: Die Zeichenfläche wird mittels seitlichen Spiegels und einer versilberten Fläche am Würfel, der über der Augenlinse zu stehen kommt, im Auge sichtbar. Durch eine Öffnung in der Versilberung des Würfels wird das vom Mikroskop entworfene Bild direkt wahrgenommen. Rauchgläser, die aufgesteckt sind oder sich in drehbarer Kappe befinden, dienen zur Dämpfung der Helligkeit der Zeichenfläche. Der Apparat wird durch einen Ring über dem Okular befestigt. Der Würfel nebst Rauchgläsern läßt sich, wenn man das Bild ohne Apparat betrachten will, zur Seite

Fig. 25.

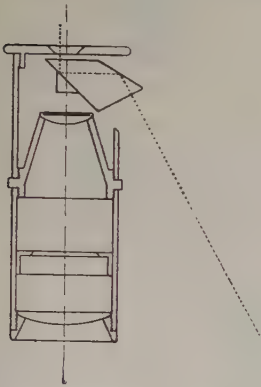
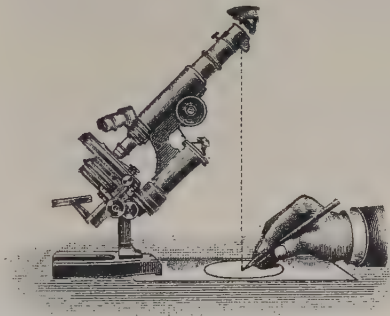
Zeichenokular von *Leitz*.

Fig. 26.



Zeichenokular und Zeichenfläche.

klappen. Die Zeichenfläche befindet sich zur Seite des Mikroskops. Soll sie in deutlicher Sehweite liegen, so nimmt man einen besonderen Zeichentisch zu Hilfe.

Die Zeichenokulare von *Leitz* (s. Fig. 25 u. 26) werden für das Mikroskop in aufrechter Stellung und für eine Neigung des Oberteils desselben unter 45° hergestellt. Die Prismen sind fest mit dem Okular verbunden.

Durch zweimalige Reflexion an den Seitenflächen des Prismas wird die Zeichenfläche sichtbar. Die Fläche unmittelbar über der Augenlinse ist versilbert und durch ein Loch in der Silberschicht und durch ein kleines Prisma, das mit der Silberschicht verkittet ist und sich über dem Loch befindet, wird das Bild des Mikroskops beobachtet.

Rauchgläser unter der Außenfläche des Prismas dienen zur Dämpfung der Zeichenfläche. Die Zeichenfläche zur Seite des Bildes bei dem einen Zeichenokular bedarf einer geneigten Lage, um verzeichnungsfreie Bilder zu liefern. Als Zeichenfläche bei dem Zeichenokular

für das um 45° geneigte Mikroskop dient die horizontale Tischfläche selbst. Sie liegt auch noch in der deutlichen Sehweite, so daß man bei dieser für den Beobachter so bequemen Stellung des Mikroskops keiner besonderen Zeichenfläche bedarf (s. Fig. 26).

Das Zeigerokular. Das Zeigerokular dient zum Markieren einer Stelle des Bildes. In der Blendenebene des Okulars befindet sich

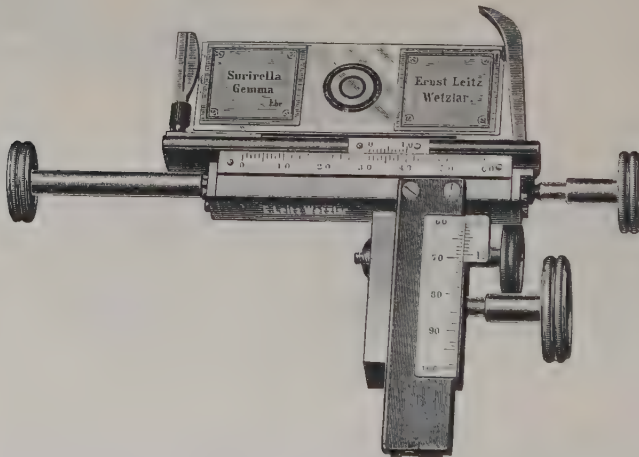
Fig. 27.



Zeiger-Doppelokular.

ein beweglicher Zeiger, dessen Spitze durch Drehung des Okulars und der Achse des Zeigers jede Stelle des Gesichtsfeldes zu bezeichnen gestattet. Ein noch vollkommenerer Apparat zum Demonstrieren ist das Zeiger-Doppelokular von Leitz (s. Fig. 27). Auch hier befindet

Fig. 28.

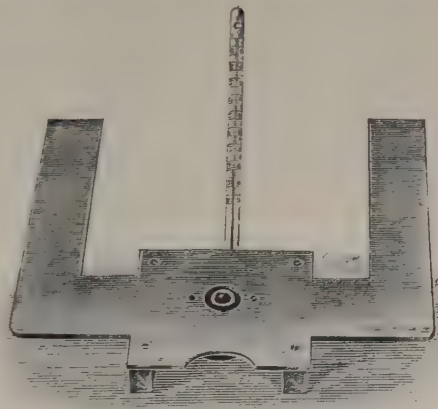


Beweglicher Objekttisch.

sich ein allseitig beweglicher Zeiger in der Blendenebene des Okulars. Durch ein Doppelpisma aber werden Zeiger und Bild auch noch einem seitlichen Beobachter sichtbar. Beide Bilder sind gleichzeitig scharf eingestellt. Zum Ausgleich von Abweichung in der Akkommodation der Augen beider Beobachter ist am seitlichen Rohr noch eine Einstellung durch Verschieben der Augenlinsen vorgesehen.

Die beweglichen Objektische (s. Fig. 28) dienen zum planmäßigen Durchsuchen großer Präparate und Schnittserien. Die Kreuztische benannten haben zwei Bewegungen senkrecht zueinander, die mittels Zahn und Trieb oder Schraube bewerkstelligt werden. Nonien gestatten das Ablesen feiner Bewegungen. Die Tische dienen auch als Finder, wenn sie sich durch die Art der Befestigung am Mikroskop immer in derselben Orientierung zur Achse einstellen. Eine durch die beiden mit Zahlen versehenen Teilungen des Tisches markierte Stelle des Präparats läßt sich auf diese Weise mit hinreichender Genauigkeit wieder finden.

Fig. 29.



Heizbarer Objektisch nach M. Schultze.

Heizbare Objektische dienen dem Zweck, Präparate bei bestimmten höheren Temperaturen beobachten zu können. Ein schon älterer, aber heute noch recht beliebter heizbarer Objektisch ist der von *Max Schultze* (s. Fig. 29).

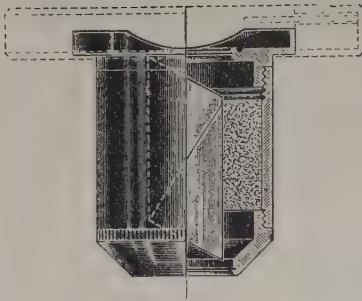
Eine größere Metallscheibe mit zwei seitlichen längeren Armen wird mittels isolierender Holzleisten auf den Objektisch aufgesetzt. Die Heizung geschieht durch Spiritusflämmchen unter den Seitenarmen. Ein in den Tisch eingelegtes Thermometer zeigt die Temperatur, die sich durch geeignete Regulierung ziemlich konstant erhalten läßt. Die Kondensorlinse im Tisch gestattet die Verwendung auch stärkerer Objektive. Andere heizbare Objektische, wie die von *Pfeiffer* und *Stricker*, werden durch Warmwasserstrom, andere durch elektrischen Strom geheizt. Ein neuer elektrischer Heiztisch ist der automatisch sich regulierende von *Leitz* für Temperaturen bis 100°, die sich auf gewünschter Höhe konstant bis zu einer Genauigkeit von $\frac{1}{2}^{\circ}$ erhalten lassen.

Der Polarisationsapparat.

Der Polarisationsapparat, dessen sich der Mediziner und Botaniker zur Untersuchung tierischer und pflanzlicher Gewebe, der Nahrungs- und Genußmittel bedient, ist im Gegensatz zu dem Polarisationsmikroskop des Mineralogen eine einfachere Einrichtung, die nur als Hilfsapparat des Mikroskops anzusehen ist, aber doch zu allen Untersuchungen organischer Gegenstände ausreicht. Nachdem *Nicol* 1829 sein noch heute nach ihm genanntes Kalkspatprisma geschaffen hatte, wurden Untersuchungen im polarisierten Lichte alsbald nicht nur am

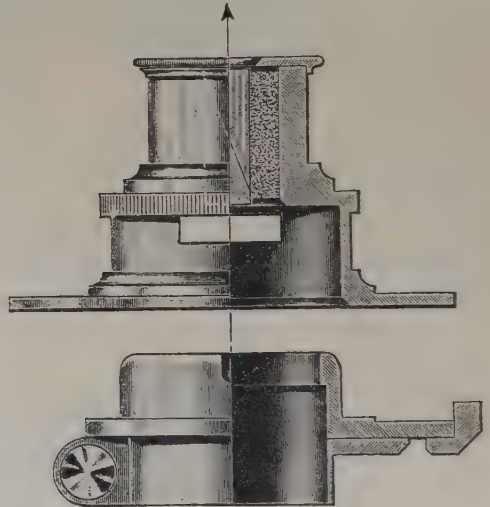
Gesteinsmaterial des Mineralogen, sondern auch an den organischen Objekten des Mediziners vorgenommen. Der für letzteren Zweck ausreichende Apparat, der sich an jedem größeren Instrument anpassen läßt, hat folgende Einrichtung. Das als Polarisator (s. Fig. 30) bezeichnete Prisma befindet sich in einer Fassung, welche in die federnde Hülse an Stelle des Kondensors eingeschoben wird. Mit ihm ist ein kleiner zweilinsiger Kondensor verbunden, dessen obere Linse bei Anwendung schwacher Objektive abgeschraubt wird. Das zweite Nicol (s. Fig. 31), der Analysator, wird in seiner Fassung über das Okular gestülpt. Er ist mit einem in 360° geteilten Kreis versehen. Zur Befestigung und Führung

Fig. 30.



Polarisator.

Fig. 31.



Analysator.

des Analysators dient ein Ring, der über dem Tubus festgeklemmt wird. Er ist mit einem Index versehen. Die Gips- und Glimmerplättchen, mit denen der Apparat ausgestattet ist, werden bei Benutzung auf dem Okular aufgelegt. Ein Schlitz am Analysator dient zur Aufnahme des Gipskeils. Plättchen und Keil haben den Zweck, durch die Änderung der Interferenzfarben, welche das Bild des Objekts erfährt, wenn sie eingeschoben werden, den Grad der Doppelbrechung des zu prüfenden Gegenstandes festzustellen. Eingehende Belehrung über den Gebrauch des Polarisationsapparates sowohl im allgemeinen als auch besonders bei Arbeiten des Mediziners und Botanikers bieten folgende Werke: *E. Weinschenk*, Anleitung zum Gebrauch des Polarisationsmikroskops. 2. Aufl., 1906. *S. Garten*, Leitfaden der Mikroskopie. 2. Aufl. 1904. *H. Ambronn*, Anleitung zur Benutzung des Polarisationsmikroskops bei histologischen Untersuchungen. 1892. *O. Fischer*, Medizinische Physik. 1913.

Das Mikrotom.

Ein unentbehrliches Werkzeug des Mikroskopikers ist seit Beginn der Achtzigerjahre des vergangenen Jahrhunderts das Mikrotom geworden. Es liefert ihm die für seine Untersuchungen erforderlichen Dünnschnitte der Präparate. Aber erst der Fortschritt in der Behandlung des Materials, der es erst schnittfähig machte, wie die Erhärtung, Einbettung, schuf dem Mikrotom Bahn, das viele Gelehrte bis dahin abgelehnt hatten, denen die Schnitte aus freier Hand genügten. Bahnbrechend für die Einführung des Mikrotoms wirkte auch das Bedürfnis. Serienschnitte für die Untersuchung zur Verfügung zu haben, die nur das Mikrotom schnell und sicher zu schaffen imstande war. Scheren, Messerchen, Lanzetten, Pinzetten, Nadeln waren früher das Handwerkzeug des Mikroskopikers, mit dem er das Präparat zergliederte; in Glaskammern wurde das Präparat gequetscht und abgeplattet, um es der Betrachtung zugängiger zu machen.

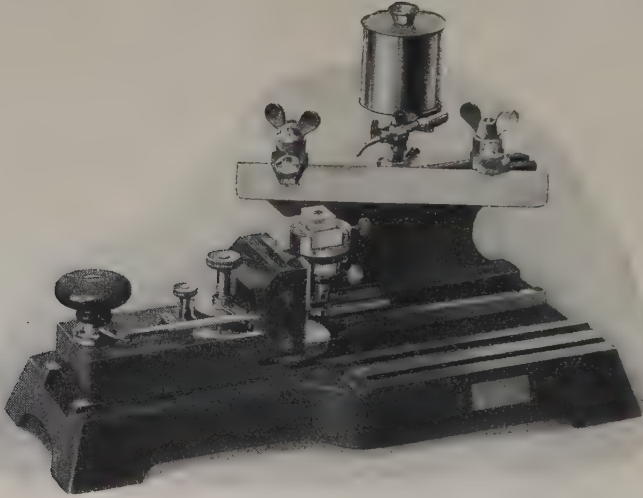
Seit etwa 40 Jahren ist das Mikrotom zu einem Präzisionsinstrument ausgebaut worden. Es sind besonders deutsche Firmen, welche sich um den Ausbau des Mikrotoms verdient gemacht haben; unter ihnen sind zu nennen: *Becker* in Göttingen, *Jung* in Heidelberg, *Leitz* in Wetzlar, *Miehe* in Hildesheim, *Sartorius* in Göttingen, *Schanze* in Leipzig. Aus den verschiedenen Methoden der Messerführung und der Einstellung des Präparats hat sich eine Reihe von typischen Formen des Mikrotoms entwickelt. Ein auf Grund langjähriger Erfahrung gebautes und den mannigfaltigsten Anforderungen gewachsenes Mikrotom von *Leitz* in Wetzlar, das Grundschlitten-Mikrotom (s. Fig. 32), soll näher besprochen werden.

Wir geben hier eine kurze Beschreibung; ausführlich findet sich das Instrument beschrieben in der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie, 1913, Bd. XXX, S. 192—202.

Auf einer starken eisernen Fußplatte läuft in Schienen ein Eisenschlitten, an dem der Objekthalter befestigt ist. Die Objektzange ist mittels eines Kugelgelenks in jeder Richtung verstellbar. Ein großer Griff dient zur Bewegung des Schlittens. Mit dem Griff verbunden ist die Vorrichtung zur Einstellung des Objekts: sie erfolgt automatisch, nachdem durch eine Stellschraube die gewünschte Schnitthöhe bestimmt ist; eine einmalige, durch die Stellvorrichtung festgelegte Drehung des Knopfes erzielt Schnittdicken von 1—20 μ . Die erste grobe Einstellung des Objekts auf die Schnitthöhe des Messers geschieht in folgender Weise. Die Spindel des Objekthalters läuft in einer Mutter, deren beide Backen gegeneinander beweglich sind und durch den Druck auf eine federnde Klemme geöffnet werden können; hierdurch wird die Spindel frei und der von ihr getragene Objekthalter kann in beliebiger Weise vertikal verschoben werden. Besondere Sorgfalt ist auf die Befestigung des Messers verwandt worden. Um der Messerfläche verschiedene Nei-

gungen zur Schnittfläche zu erteilen, ist die untere Wange der Klemme beweglich. Soll die Messerschneide unter einem sehr spitzen Winkel auf die Schnittfläche wirken, also ein langer Zug des Messers ausgeübt werden, so befestigt man dasselbe mittels einer oder zwei Klemmen an dem langen auf der einen Seite des Mikrotoms angebrachten Messerhalter. Will man die Druckwirkung des Messers kräftiger ausnutzen, so wird es quer gestellt und die Befestigung geschieht beiderseits der

Fig. 32.



Grundschlittenmikrotom.

Schnittbahn an dem erwähnten Messerhalter und einer Säule, die sich längs einer Rinne verschieben läßt. Durch diese Anordnungen ist der Stellung des Messers zur Schnittfläche der weiteste Spielraum gegeben.

Die geschilderten Einrichtungen des Mikrotoms ermöglichen allen Anforderungen, die das Schnittmaterial an das Mikrotom stellt, zu genügen. Ein Versagen des Schnittes ist durch die Messerbefestigung und die sichere Haftung des Schlittens ausgeschlossen. Die vorteilhafte Einrichtung, daß die Bewegung des Schlittens und die Einstellung des Objekts durch den Griff einer Hand erfolgt, die am Knopf des Schlittens anfaßt, macht sich bei Herstellung von Serienschnitten besonders geltend.

Über Dunkelfeld- und Ultramikroskopie*.

Von Prof. Dr. **Felix Jentzsch-Graefe**, Gießen.

Mit 14 Textabbildungen.

Blickt man heutzutage in ein gewöhnliches Mikroskop, so beobachtet man einen mehr oder minder hellen Hintergrund, auf dem sich das Objekt in verschiedenen Farben oder in verschiedenen Helligkeitsabstufungen, aber immer dunkel auf hellem Grund abhebt. Man arbeitet also für gewöhnlich im durchfallenden Licht. Es war das keineswegs immer so. Zeitweise verwendete man vielmehr so häufig auffallendes Licht, daß das Gegenteil besonders betont wurde.

In den großen Lehrbüchern der Mikroskopie aus der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts, die auch heute noch für sehr vieles maßgebend sind, unterschied man zwischen einem „negativen“ und einem „positiven“ Bild im Mikroskope, wobei als Negativ ein dunkles Bild auf hellem Grunde und als Positiv ein helles Bild auf dunklem Grunde bezeichnet wurde. Diese Begriffe finden sich bisweilen auch heute noch, obwohl jetzt die Bezeichnung *Hellfeld* und *Dunkelfeld* üblicher geworden sind, die man wegen ihrer Anschaulichkeit auch vorziehen wird.

Bei Verwendung der gewöhnlichen Beleuchtung, also bei *Hellfeldbeleuchtung*, laufen die beleuchtenden Strahlen direkt bis zum mikroskopischen Bilde bzw. dem Auge des Beobachters, wodurch natürlich die Strahlen, die keine Teile des Objektes zu durchsetzen haben, am hellsten erscheinen und also der Hintergrund stets heller als das Objekt sein muß. Wird aber durch irgend eine Vorrichtung bewirkt, daß die aus dem Beleuchtungsapparat kommenden Strahlen nicht direkt bis zum Bild gelangen können, so muß der Hintergrund dunkel erscheinen. Befindet sich im Strahlenverlauf ein materielles Objekt, so wird das Licht an den äußeren Begrenzungen oder auch den inneren Strukturtrennungsflächen des Objektes zur Seite geworfen, es wird „gebeugt“. Tritt solches gebeugtes Licht in das Objektiv ein, so muß man also ein leuchtendes Objekt auf schwarzem Grunde wahrnehmen. Dieses ist das Wesen der *Dunkelfeldbeleuchtung*.

Es ist klar, daß hierbei die Möglichkeit, solche Kanten und Grenzflächen wahrzunehmen, von nichts weiter abhängt, als von der Intensität der Beleuchtung. In der Tat gibt es ein Auflösungsvermögen, eine

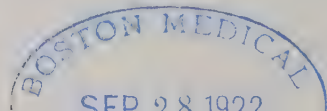
* Dieser Artikel lag der Redaktion bereits am 20. Juni 1914 in der Hauptsache vor. Die später erfolgten Zusätze sind durch Kleindruck gekennzeichnet.

theoretische Begrenzung der Sichtbarkeit bei einer derartigen Anordnung überhaupt nicht. Man kann vielmehr beliebig kleine Objekte wahrnehmen, wenn sie nur hell genug beleuchtet sind. Die Grenze wird hier nicht durch die mikroskopische Optik, sondern durch den Stand der Beleuchtungstechnik bestimmt. Dabei ist das Wahrnehmen der Existenz solcher kleinen Objekte allerdings sehr zu unterscheiden von der Wahrnehmung irgendwelcher Einzelheiten. Für dieses letztere gilt natürlich die bekannte Grenze, über die hinaus kein Instrument, das Lichtwellen verwendet, führen kann.

Daß die mikroskopischen Objekte eine bestimmte Größe haben müssen, damit man sie noch deutlich erkennen und unterscheiden kann, ist so lange bekannt wie das Mikroskop selbst. Doch glaubte man früher, daß es nur an der Unvollkommenheit unserer Instrumente läge, wenn diese Grenze nicht weiter hinausgeschoben wird. Nachdem *Harting* u. a. diese Grenze experimentell zu etwa 0.3μ bestimmt hatten (u. zw. bei einem Immersionsobjektiv* $f = 1.87 \text{ mm}$ von *Hartnack*), wurde einige Jahrzehnte später, im Jahre 1873 gezeigt, daß auch theoretisch eine weitere Auflösung nicht zu erwarten ist. *Helmholtz*¹ bewies mathematisch, daß man nur die Form solcher selbstleuchtender Körper erkennen könne, deren Dimension größer als $\frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$ ist, wobei λ die Wellenlänge des Lichtes und $n \cdot \sin \alpha = a$ die Apertur des benutzten Objektivs bedeuten. Im selben Jahre, doch früher als *Helmholtz*, bewies *Abbe*² experimentell, daß an nicht selbstleuchtenden Körpern, wie es die mikroskopischen Objekte bei Hellfeldbeleuchtung sind, Teile nur dann optisch getrennt werden können, wenn außer dem ungebeugten Licht noch mindestens das erste durch Beugung am Objekt erzeugte Lichtbüschel in das Objektiv eintreten kann. Das ist aber das gleiche wie die *Helmholtzsche* Bedingung. Es lautet also die berühmte *Abbe-Helmholtzsche* Beziehung $d \geq \frac{\lambda}{2a}$. Bei Natriumlicht und einer Apertur von $a = 1.30$ ist demnach der kleinste noch auflösbare Abstand zweier Elemente mindestens $d = 0.23 \mu$.

Einen theoretischen Beweis dieser Formel hat *Abbe* niemals veröffentlicht, wohl aber hat er ihn in den Vorlesungen, die er im Jahre 1887 an der Universität Jena hielt, gegeben. Diese Vorlesungen sind vor einigen Jahren von *O. Lummer* und *Fr. Reiche*³ im Druck herausgegeben worden. Aber erst ganz neuerdings ist von *M. v. Laue*⁴ gezeigt worden, daß ein früher von vielen Seiten vermuteter Unterschied zwischen der Abbildung selbstleuchtender und nicht selbstleuchtender Objekte überhaupt nicht besteht, so daß also die *Helmholtzsche* Ableitung allgemein gültig ist.

* Das erste Immersionsobjektiv wurde 1850 von *Amici* beschrieben.



Auf Grund dieser Formel kann man auf zwei verschiedenen Wegen erwarten, zu einer Erweiterung der Grenzen unserer Wahrnehmung zu gelangen. Einmal, indem man die Apertur a des Objektivs vergrößert und zweitens, indem man λ , die Wellenlänge des zur Benutzung kommenden Lichtes, verkleinert. In beiden Fällen wird sich die noch auflösbare Strecke d verkleinern. Beide Wege sind auch eingeschlagen worden, aber bei beiden ist man bald auf technische Grenzen gestoßen. Die größten Aperturen der im Handel befindlichen Objektive betragen bekanntlich $a = 1.40$. Bei Benutzung der üblichen Immersionsflüssigkeit, des Zedernöls, ist es nicht möglich, erheblich weiter zu kommen, da der Brechungsindex nicht hoch genug ist. Deshalb suchte *Abbe* eine andere Immersionsflüssigkeit, und fand am geeignetsten das Monobromnaphthalin. Es gelingt hiermit in der Tat Aperturen bis etwa $a = 1.60$ zu erzielen, aber das Mikroskopieren hiermit ist sehr teuer. Man muß nämlich für Objektträger und Deckglas in diesem Falle sehr hoch brechende Flintgläser wählen, da ja sonst die Strahlen mit hoher Apertur gar nicht durch das Deckglas hindurchtreten können. Die Deckgläser aus Flintglas können aber nicht wie die gewöhnlichen dünnen Deckgläser geblasen werden, sondern müssen genau wie Linsen geschliffen und poliert werden, stellen sich also im Verbrauch recht teuer. Ferner aber, und das ist vielleicht noch wichtiger, müssen auch die Objekte selbst in ein hochbrechendes Medium eingebettet sein. Es gibt aber nur wenige Objekte, die eine Berührung mit einer so hoch brechenden Einbettungsflüssigkeit auf die Dauer vertragen. Nur wenige Diatomeen halten es wenigstens eine Zeitlang aus, sonst wird alles sehr bald zersetzt und aufgelöst. Deshalb werden diese Monobrom-Naphthalin-Immersionen heute auch von keiner Firma mehr fabriziert.

Der andere Weg die Auflösungsgröße zu verschieben, besteht in einer Verkleinerung der Wellenlänge. So hat z. B. die jetzt nicht mehr bestehende Firma Hartnack bereits auf der Wiener Ausstellung vom Jahre 1873 demonstriert, wie das Auflösungsvermögen eines Mikroskops im blauen Licht wesentlich größer ist, als im gelben. Doch mag auch schon früher in dieser Richtung gearbeitet worden sein. Die neueren Versuche sind hauptsächlich von *A. Köhler*⁵ in Jena ausgeführt worden, der ultraviolette Strahlen von $\lambda = 0.275 \mu$ zur Beleuchtung benutzt, indem er als Lichtquelle eine Magnesiumfunkenstrecke verwendet. Es sind zwar mit diesem Ultraviolettmikroskop prächtige Bilder erzielt worden, aber bis jetzt ist anscheinend noch nichts damit beobachtet worden, von dem sicher feststeht, daß es nicht auch im gewöhnlichen Mikroskop beobachtet werden kann. Bedenkt man, daß dieser geringe Erfolg das Resultat einer nunmehr 15jährigen Tätigkeit ist, so kann man wohl ein gewisses Bedauern empfinden. Denn prinzipiell ist dieser Weg zweifellos geeignet, unsere Erkenntnis zu vermehren. Die Schwierigkeiten liegen hier hauptsächlich daran, daß unter dem Einfluß der ultravioletten Strahlen die Linsen der Objektive und vor

allem der Balsam, mit dem die einzelnen Korrektionslinsen verkittet sind, zu fluorescieren anfangen, so daß sich ein Lichtnebel über das Bild legen würde. Um das zu vermeiden, hat *M. v. Rohr* besondere Monochromaten konstruiert, das sind Objektive aus lauter einzelnen Quarzlinsen (5—6), die nur für eine Farbe korrigiert sind. Da das menschliche Auge ultraviolette Strahlen nicht wahrnehmen kann, so kann nur photographisch gearbeitet werden. Das ist sehr umständlich und führt auch nicht immer gleich zum Ziel, da man oft die gewünschten Bilder mit dem beigegebenen Fluorescenzokular nicht sofort einstellen kann und dann ganze mikroskopische Serienaufnahmen bei dauernder Änderung der Einstellung vornehmen muß, um endlich eine Übersicht über das Präparat zu erhalten. Auch beim gewöhnlichen Mikroskopieren ist bekanntlich das ständige Spielenlassen der Feinbewegung sehr wesentlich. Dieses *Köhlersche* Ultraviolettmikroskop hielt jedenfalls in der Praxis nicht das, was man theoretisch von ihm verlangen konnte. Es hat daher auch nur eine ganz geringe Verbreitung gefunden.

Ganz anders verhält es sich mit der Methode der Dunkel-feld-mikroskopie. Hier ist zwar von einer vermehrten Auflösung keine Rede, sondern nur von einer erleichterten bzw. ermöglichten Sichtbarmachung. Indessen für viele Fälle genügt es ja durchaus, die Existenz von Gegenständen festzustellen, vor allem für Diagnosen und auch bei Zählungen. In dieser Beziehung aber sind prinzipiell keine Grenzen gesetzt, denn der Kontrast zwischen Hell und Dunkel, auf den es allein ankommt, kann durch Verwendung hinreichend intensiver Lichtquellen beliebig gesteigert werden.

Bei der folgenden Beschreibung dieser Apparate für Dunkelfeldbeleuchtung folgen wir der historischen Entwicklung. Schon im Beginn des 19. Jahrhunderts machte man die Beobachtung, daß die Auflösung eines Objektes gesteigert wird, wenn die beleuchtenden Strahlen schief einfallen. Bewegte man nun den Spiegel, mit dem man zuerst allein arbeitete, so trat bald der Fall ein, daß überhaupt kein Licht vom Spiegel mehr in das Objektiv eindringen konnte, obwohl noch das Objekt durchstrahlt wurde. Gleichzeitig änderte sich plötzlich der Charakter des Bildes. Es schlug aus einem Negativ in ein Positiv um. Man hatte Dunkelfeldbeleuchtung. Dasselbe erzielt man bequem, wenn der Kondensor einseitig abgeblendet ist, oder mit einer Zentralblende versehen wird. Durch die Liebenswürdigkeit von Herrn Geheimrat Prof. Dr. *Strahl* in Gießen besaß ich einen aus dem Jahre 1840 stammenden Beleuchtungsapparat der Firma Ross, der als Kondensor ein Mikroskopobjektiv mit Zentralblendenvorrichtung benutzt (vgl. Fig. 33).

Derartige Einrichtungen sind dauernd verwendet worden. Ja in vielen optischen Werkstätten wurden bis in die Neunzigerjahre des 19. Jahrhunderts regelmäßig zum Beleuchtungsapparat Zentralblenden für Dunkelfeldbeleuchtung mitgeliefert. Doch unterblieb das allmählich,

da das Interesse an der Dunkelfeldbeleuchtung, so rege es früher gewesen war, dauernd zurückging.

Da wurde im Jahre 1903 in der Kolloidchemie ein neues Anwendungsgebiet für die Mikroskopie gefunden. Durch sinngemäße Ausgestaltung der Dunkelfeldmethoden gelang es, viel kleinere Partikel als früher sichtbar zu machen. Die neue Bezeichnung: „Ultramikroskop“ wurde zum Schlagwort. Gar vielen erschienen damals die neuen Apparate als etwas von Grund aus Neues. Und doch handelte es sich nur um eine Forscherarbeit, die auf Längstbekaantem ein wenig weiter-

Fig. 33.



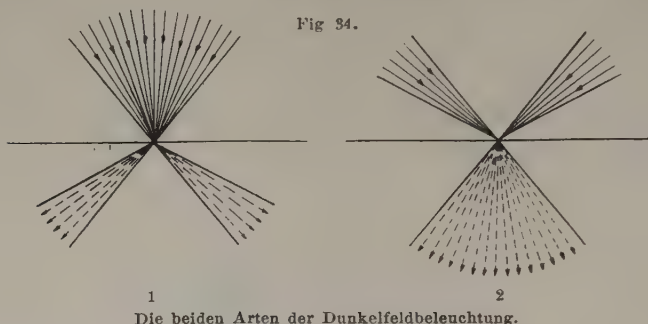
Linsenkondensor mit verschiedenen Zentralblenden
von Ross, aus dem Jahre 1840.

gebaut hatte, um Methoden, die man schon längst mit Erfolg hätte benutzen können, wenn man sie nur eben wirklich angewandt hätte. Das allgemeine Interesse brachte es mit sich, daß alle diese Fragen von neuem durchgearbeitet wurden, wobei zu dem Alten auch wirklich Neues hinzukam, vor allem die bispährischen Spiegelkondensoren (s. weiter unten).

Die ältesten Dunkelfeldmethoden verwendeten also die koaxiale Anordnung, d. h. Kondensor und Objektiv besitzen dieselbe optische Achse.

Diese ganzen Anordnungen kann man in zwei Gruppen teilen, wie aus der Fig. 34, die einer Arbeit des Verfassers aus dem Jahre 1910 entnommen ist, hervorgehen wird. Es müssen, wie oben schon auseinander-gesetzt, die das Objekt und das Objektiv durchsetzenden Strahlen irgendwie abgeblendet werden, u. zw. geschieht dies im Falle 1 im Kondensor, im Falle 2 im Objektiv. Eine Verwirklichung des Falles 1

sind jene alte Anordnung aus dem Jahre 1840, die Methode der Zentralblende im Kondensor und alle modernen Spiegelkondensoren. Eine Verwirklichung des Falles 2 ist die Stempelblende im Objektiv bzw.



das Objektiv mit abgeschliffener Frontlinse. Im allgemeinen ist der Anordnung 1 der Vorzug zu geben, da, wenn die Zentralblende in das Objektiv verlegt wird, aus beugungstheoretischen Gründen, die hier nicht zu erörtern sind, die Abbildung des Objektes wesentlich ver-

Fig. 35.



Paraboloidkondensor von Wenham aus dem Jahre 1856.

schlechtert wird. Man kann sich leicht davon überzeugen, wenn man ein zentral abgeblendetes Objektiv bei Hellfeldbeleuchtung benutzt.

Die Methode der Dunkelfeldbeleuchtung nahm einen großen Aufschwung, als in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts die Spiegelkondensoren in England auftraten. Die größte Verbreitung erlangte der 1850 von F. H. Wenham⁶ erfundene parabolische Dunkelfeldkondensor

(Fig. 35), der zuerst aus Metall und hohl, seit 1856 als volles Glasparaboloid hergestellt wurde. Es ist das genau dieselbe Vorrichtung, die 1907 (bzw. 1904) von *Siedentopf*⁷ erfunden wurde. Der einzige Unterschied besteht darin, daß die heutigen Paraboloidkondensoren stets für Immersionsgebrauch eingerichtet sind, während das mir zur Verfügung stehende *Wenhamsche* Paraboloid nur für Trockensysteme bestimmt ist. Indessen hat bereits *Wenham* selbst auf die Wichtigkeit der Immersion zwecks Ausnutzung höherer Aperturen hingewiesen und auch Paraboloidkondensoren mit Immersion angefertigt. Selbstverständlich besteht daneben ein wesentlicher Unterschied in der theoretischen Auffassung zwischen jenen Zeiten und heute insofern, als man damals die Theorie der Abbildung durch Beugung im Objekt, wie sie *Abbe* für das Mikroskop entwickelte, noch nicht kannte. Man faßte also die Dunkelfeldbeleuchtung nicht als einen Vorgang auf, bei dem das Objekt durch Beugung sozusagen selbstleuchtend wird, sondern als eine Beleuchtung im auffallenden Lichte, die durch Totalreflexion am Deckglas entstehen sollte. Übrigens kann tatsächlich in gewissen Fällen beides zugleich zutreffen.

Zur gleichen Zeit wie die Firma Zeiß den alten *Wenhamschen* Paraboloidkondensor wieder einführte, wurde von der Firma Reichert in Wien ein Spiegelkondensor hervorgebracht, der eine einfache plan-konvexe Linse darstellt, die auf der sphärischen Seite in der Mitte plan abgeschliffen ist. Dieser Kondensor, der von *O. Heimstädt*⁸ 1906 als neu beschrieben wurde, ist in Wirklichkeit bereits 1879 von *J. W. Stephenson*⁹ (demselben, der auch die erste homogene Ölimmersion darstellte) erfunden worden.

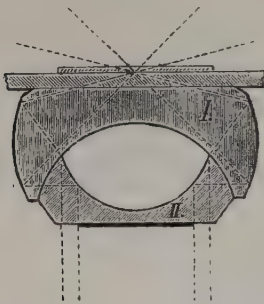
Obwohl diese beiden Konstruktionen für viele Zwecke ausreichen mögen, sind doch die Spiegelkondensoren, die zwei Spiegelflächen verwenden, allen denen mit nur einer Fläche prinzipiell überlegen. Denn es ist wohl ohneweiters klar, daß man mit drei Konstruktionselementen, wie sie in zwei Kugeln gegeben sind, nämlich den beiden Radien und dem Mittelpunktabstand, eine bessere Korrektur erreichen kann, als mit einer einzigen Parabel oder Kugel. Bei allen diesen Konstruktionen wird die eine Kugel als konkaver, die andere als konvexer Spiegel benutzt, so daß die sphärischen Aberrationen entgegengesetzten Sinn haben und sich zum allergrößten Teile aufheben. In der verschiedenen Art und Weise wie die verbleibenden Fehlerreste verteilt sind, bestehen allein die Unterschiede der verschiedenen Konstruktionen dieses Typus.

Der erste bispähische Spiegelkondensor wurde von *W. v. Ignatowsky*¹⁰ angegeben und wird seit Oktober 1907 von *E. Leitz* in Wetzlar ausgeführt (s. Fig. 36). Die Konstruktion des *Leitzschen* Kondensors wurde von *H. Siedentopf*¹¹ aufgenommen und unter der Bezeichnung Kardiodkondensor seit dem Jahre 1910 auch von der Firma Zeiß in den Handel gebracht (s. Fig. 37). *H. Siedentopf* hat eine interessante geometrische Beziehung zwischen Kreis und Kardioide entdeckt, die un-

gefähr der bekannten Brennpunkteigenschaft der Parabel entspricht und noch außerdem die Erfüllung der Sinusbedingung liefert. *Siedentopf* glaubte zuerst, daß auf dieser Erkenntnis die optische Leistung des bispährischen Spiegelkondensors beruhe. Daher wählte er für das Erzeugnis der Firma Zeiß gewissermaßen als Fabrikmarke die Bezeichnung „Kardioidkondensor“, wodurch vielfach die falsche Annahme erweckt wurde, eine Spiegelfläche in diesem Kondensor sei ein Kardioid. Neuerdings findet man in den Druckschriften der Firma Zeiß nirgends mehr die Behauptung, daß ihr Kondensor etwas anderes sei, als die bekannte bispährische Konstruktion.

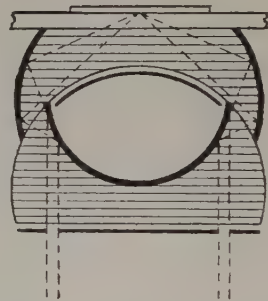
Der Firma Leitz gelang es, ihren bispährischen Spiegelkondensor noch wesentlich zu verbessern. Diese neue Form wird seit dem Jahre

Fig. 36.



Spiegelkondensor von Ignatowsky.

Fig. 37.



Kardioidkondensor von Siedentopf.

1910 nach den Angaben von *Felix Jentsch*¹² unter dem Namen „konzentrischer Kondensor“ fabriziert. Diese Verbesserung gründet sich auf eine vom Verfasser zuerst hervorgehobene merkwürdige Eigenschaft zweier spiegelnder konzentrischer Kreise, daß sich nämlich bei diesem unendlich viele Strahlenpaare angeben lassen, die streng aplanatisch vereinigt werden*.

Die äußere Form dieses Kondensors zeigt Fig. 38. Bezüglich weiterer Einzelheiten muß auf die Arbeit des Verfassers und die Druckschriften der Firma Leitz verwiesen werden.

Handhabung des konzentrischen Spiegelkondensors.

Nach Entfernung des Linsencondensors aus dem Beleuchtungsapparat des Mikroskops wird an seiner Stelle der Spiegelkondensor (Form A) in die Hülse bis zum Anschlag eingeschoben oder der plattenförmig gefaßte Spiegelkondensor (Form B) auf den Objektisch aufgesetzt.

Die Zentrierung erfolgt mit einem schwachen Objektiv (Leitz Nr. 2 oder 3) so lange, bis die auf der Oberfläche eingeritzten Ringe konzentrisch zur Gesichts-

* Diese Art der Strahlenvereinigung ist inzwischen von *Staeble* (Münchener Akademie, Mai 1919) und von *Lihotzky* (Wiener Akademie 1919) näher untersucht und als bedeutungsvolle Erweiterung der *Abbeschen* Sinusbedingung erkannt worden. Sie führt jetzt den Namen *Isoplanasie*.

feldblende liegen; beim Hell-Dunkelfeldkondensor so lange; bis der mattierte weiße Fleck ebenso liegt.

Sämtliche Spiegelkondensoren sind Immersionssysteme. Es muß also stets zwischen Kondensor und Objektträger ein Tropfen Flüssigkeit (Öl oder Wasser) gebracht werden. Der Kondensor wird sodann in der Höhe so lange verstellt, bis der Kontrast am größten ist. Das ist dann der Fall, wenn die anfangs meist ringförmig beleuchtete Fläche sich zu einem kleinen Kreise zusammengezogen hat.

Jetzt kann man zur eigentlichen Beobachtung übergehen, wobei man gut tut, zur Vermeidung unnötiger, das Bild verschleiender Reflexe ein Immersionssystem zu verwenden; empfohlen wird die Fluorit-Immersion $\frac{1}{12}$ a mit Trichterblende oder das Fluoritsystem $\frac{1}{7}$ a mit der Apertur 0.95.

Von höchster Bedeutung ist peinlichste Sauberkeit sowohl des Objektträgers wie des Deckglases; jeder kleinste Kratzer stört. Das Tragglass soll 1 mm, das Deckglas 0.17 mm dick sein. Genaueste Einhaltung dieser Daten erleichtert die Beobachtung wesentlich.

Das Präparat muß möglichst dünn sein.

Lichtquellen.

Bei der Dunkelfeldbeleuchtung mit Spiegelkondensor wird die Lichtquelle selbst im Präparat abgebildet, so daß vor allem zu verlangen ist, daß das vom Kondensor entworfene Bild mindestens so groß wie das mikroskopische Gesichtsfeld ist und dieses gleichmäßig ausfüllt. Gewöhnliche Glühlampen sind also nur bei Zwischenschaltung einer Mattscheibe brauchbar, die die einzelnen Glühfäden als solche unsichtbar macht. Um die Intensität zu steigern, verwendet man schwach geölte Mattscheiben. Wesentlich besser sind die neuen Halbwatt-Glühbirnen mit eng aneinander liegenden gitterförmigen oder spiralig aufgerollten Glühfäden.

Bei weitem die geeignetste Lichtquelle für Dunkelfeld- und Ultramikroskopie ist der gleichmäßig leuchtende Krater einer Bogenlampe, besonders handlich in Form der Liliput-Bogenlampe mit rechtwinklig stehenden Kohlen. Das oft lästige Nachregulieren von Hand wird bei der neuen Ausführungsform der Firma Leitz durch ein mechanisches Uhrwerksgetriebe vermieden. Die Lampe wird so geneigt, daß das von ihrer Kollimatorlinse ausgehende nahezu parallele Strahlenbündel den Planspiegel des Mikroskops trifft und voll ausfüllt. Ist das Dunkelfeldbild zu hell oder nach den Rändern des Gesichtsfeldes im Kontrast abfallend, so beseitigt man diese Mängel durch künstliche Vergrößerung, d. h. man schaltet auch hier zwischen Lampe und Mikroskopienspiegel nahe dem Spiegel eine schwach geölte Mattscheibe ein.

Die Beleuchtungsvorrichtung der Firma C. Reichert mit einem kleinen Niedervoltlämpchen, das direkt unter dem Kondensor angebracht wird, wie sie z. B. von L. Arzt³⁷ beschrieben wurde, scheint sich weniger eingeführt zu haben.

Trockensysteme können meist ohne besondere Abblendung verwendet werden, bei Immersionsobjektiven ist es nötig, eine Trichterblende einzusetzen, wodurch der in Fig. 39 dargestellte Strahlenverlauf entsteht. Neuerdings werden auch Spezialobjektive für Dunkelfelduntersuchungen ausgeführt, d. h. Ölimmersionen mit der numerischen Apertur von 0.85—0.95.

Da die meisten Präparate, die im Dunkelfeld untersucht werden sollen, sich in wässrigen Flüssigkeiten befinden, deren Brechungsindex ca. 1.33 beträgt, wäre es ganz zwecklos, einen Spiegelkondensor mit höherer Apertur als etwa 1.30—1.35 zu benutzen. Denn die Strahlen höherer Apertur könnten gar nicht bis ins Präparat gelangen, sondern

würden schon vóher durch Totalreflexion zur Seite geworfen werden. Deshalb gibt man dem Spiegelkondensor einen Aperturbereich von 1.05—1.35. Übrigens würde es optotechnisch ein Leichtes sein, Spiegelkondensoren mit sehr viel höheren Aperturen anzufertigen als sie etwa für Bakterienuntersuchungen einen Zweck haben. Man gelangt bis zu 1.65.

Die Spiegelkondensoren zeichnen sich vor den Linsenkondensoren dadurch aus, daß sie keine Farbfehler aufweisen (es werden bekanntlich alle Farben ohne Dispersion in der gleichen Richtung gespiegelt) und daß die Korrektur der sphärischen Fehler bis zu einem Grade gelingt, der den Zustand der besten Apochromatobjektive bei weitem übertrifft, mit dem sich also der recht mangelhafte Zustand der gewöhnlichen

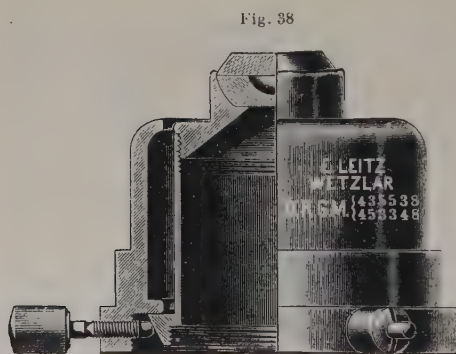


Fig. 38
Konzentrischer Spiegelkondensor von Jentzsch
in Fassung mit Zentriervorrichtung.

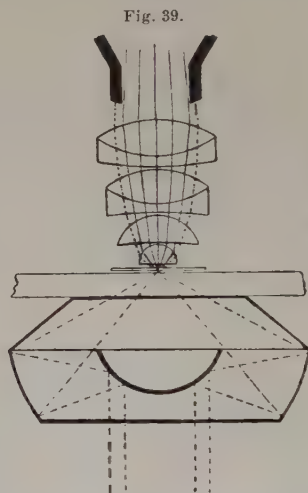


Fig. 39.
Strahlengang im konzentrischen
Kondensor bei Verwendung einer
Ölimmersion $\frac{1}{12}$ mit Trichterblende.

Linsenkondensoren auch nicht entfernt messen kann. Außerdem fällt bei ihnen eine Erscheinung vollständig fort, die bei den Linsenkondensoren eine oft recht unangenehme Störung mit sich bringt. An den 4—6 freien Linsenoberflächen der gewöhnlichen Kondensoren gehen jedesmal ca. 5% durch Reflexion verloren. Dadurch tritt nicht nur eine fühlbare Schwächung der Intensität ein, sondern diese reflektierten Strahlen können durch eine weitere Reflexion nach oben geworfen werden, sich mit den am Objekt abgebeugten Strahlen mischen und in das Objektiv eintreten. Das gibt natürlich einen Schleier über das ganze Bild, der umso störender wirkt, als die Intensität der gebeugten Strahlen und die von zweimal reflektiertem Licht ungefähr von der gleichen Größenordnung ist.

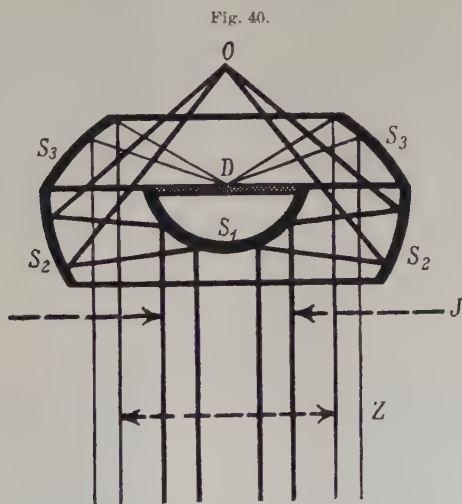
Die Spiegelkondensoren können für sehr viele Aufgaben mit Erfolg benutzt werden. Von besonderer Bedeutung ist es aber, daß man mit

ihrer Hilfe Bakterien im lebenden und ungefärbten Zustande beobachten kann und unter Verwendung von Bogenlicht auch Momentphotographien lebender Bakterien herzustellen vermag. Eine besondere Verbreitung haben die kinematographischen Aufnahmen von *Comandon* erlangt. Eine wichtige Rolle spielen die Spiegelkondensoren für die frühzeitige Diagnose von Syphilis, zuerst von *Landsteiner*¹³ und *Mucha* angewandt.

Über das Aussehen der Bakterien im Dunkelfeld sind bisweilen falsche Ansichten geäußert worden. So haben vor allem die Arbeiten von *Gaidukow*¹⁴ zu einer unrichtigen Beurteilung beigetragen. Insbesondere sind gerade seine „schematischen Abbildungen der Bakterien im Dunkelfeld“, wie er sie a. a. O. S. 35, gegeben hat, zweifellos falsch. Das ist auch von mehreren Seiten, so von *Molisch*¹⁵ und von *Arthur Meyer*¹⁶ richtiggestellt worden. In Wirklichkeit ist eine gewisse Übung nötig, um die Dunkelfeldbilder richtig zu deuten und man wird gut tun, durch beständige Vergleichung mit dem Hellfeldbild sich eine richtige Auffassung allmählich anzueignen.

Hell-Dunkelfeldkondensor.

In der Erkenntnis, wie wichtig es ist, mit einem einzigen Griff den Übergang von der einen zur anderen Beleuchtungsart vollziehen zu können, habe ich



Konzentrischer Hell-Dunkelfeldkondensor
von Felix Jentsch.

bereits 1911 einen konzentrischen Hell-Dunkelfeld-Spiegelkondensor angegeben (D. R. P. Nr. 245.327 vom 15. Juli 1911), der die spezifischen Vorzüge des einflächigen (paraboloidischen) Kondensors, nämlich geringe Empfindlichkeit gegenüber Zentrierungsfehlern und Azimutfehlern u. s. w., mit denen des zweiflächigen (konzentrischen) Kondensors, nämlich aplanatische Strahlenvereinigung

und geringen Abfall der Lichtintensität nach dem Rande hin, zur Vereinigung bringt.

Die ersten Versuche fanden kein Interesse. Infolge des Krieges und meines Ausscheidens aus der Firma Leitz sind sie nicht weiter fortgeführt worden und ist die Einführung in die Praxis bisher unterblieben. Neuerdings sind die Arbeiten bei der Firma Leitz wieder aufgenommen und soeben im Sommer 1921 beendet worden. Wie Fig. 40 zeigt, wird durch Ausklappen der Zentralblende *Z* und Schließen der Irisblende *J* Dunkelfeldbeleuchtung, durch Öffnen der Zentralblende und Einklappen der Irisblende Hellfeldbeleuchtung erzeugt. Die Fläche *D* ist ein diffus reflektierender Lackfleck.

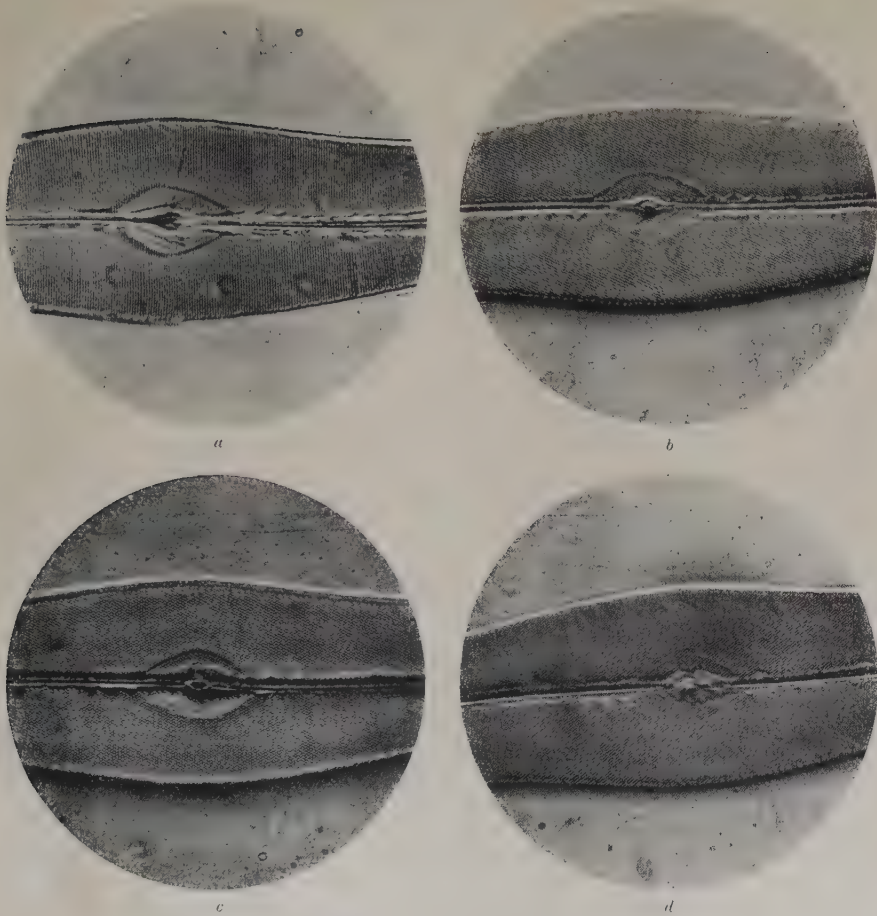
Durch gleichzeitiges Betätigen beider Blenden kann jede gewünschte Abstufung, auch sog. neutrale Beleuchtung, erzielt werden. Bei letzterer, die zuerst von *H. Siedentopf* beschrieben wurde, überlagert sich positive und negative Abbildung in gleicher Helligkeit. Da die Beugungswirkung im wesentlichen von der Differenz im Brechungsvermögen zweier aneinander grenzender Stellen des Präparates abhängt, können einzelne Elemente des Objekts bereits als positives Dunkelfeldbild, andere noch hellfeldartig erscheinen. Man hat somit in der Erzeugung der neutralen Abbildung einen Ansatz zu einer Art von qualitativer Mikrorefraktometrie, deren weitere Ausarbeitung sich gewiß lohnen würde.

Von der Firma Zeiß wurde 1915 zu dem gleichen Zweck ein Wechselkondensor von *H. Siedentopf*¹⁷ in den Handel gebracht, der eine etwas abweichende Form des Paraboloidkondensors ist.

Der Grund für diese Irrtümer liegt in einer großen Empfindlichkeit gerade der Bakterien gegenüber dem Azimut der Beleuchtung. Es ist eine bekannte Erscheinung, die sich auch im Hellfeld leicht beobachten läßt, daß bei einseitiger Beleuchtung ein strichförmiges Objekt dann am deutlichsten erscheint, wenn das Licht senkrecht zur Längsausdehnung auftrifft. Das ist z. B. sehr leicht an der bekannten Testdiatomee *Pleurosigma angulatum* nachzuprüfen, indem man die Iris des Beleuchtungsapparates eng zuzieht und stark exzentrisch stellt (siehe Fig. 41). Je nach der Lage des Präparates erscheinen dann die Schuppen längs-, quer- oder schräggestreift. (Besonders gut gelingt der Versuch mit *Leitz*-Objektiv Nr. 7.) Genau so liegt der Fall bei den Bakterien und besonders den Spirochäten, wo bei einer ganz geringen Schiefe der Beleuchtung die einzelnen Windungen so verschieden hell erscheinen, daß sich unter Umständen die ganze Spirochäte in eine Strich- oder Punktreihe auflöst. Daß auch bei stäbchenförmigen Bacillen Ähnliches auftritt, zeigt Fig. 42, die einer Arbeit von *Arthur Meyer*¹⁸ entnommen ist. Deshalb ist gerade bei bakteriologischen Untersuchungen eine genaue Zentrierung des Kondensors und eine ganz gerade Stellung des Spiegels höchst wesentlich. Aus demselben Grund, d. h. wegen des sog. Azimutfehlers sind viele ältere Dunkelfeldmethoden und von neueren das sog. Ultramikroskop von *Cotton* und *Mouton*¹⁸ unbrauchbar. Deshalb eignet sich auch das später zu besprechende Spaltultramikroskop von *Siedentopf* und *Zsigmondy*, abgesehen von anderen Gründen, nicht zur Untersuchung von Bakterien, außer etwa den kugelförmigen Kokken.

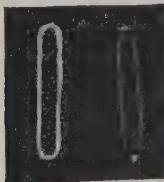
Die Spiegelkondensoren für Dunkelfeldbeleuchtung sind noch für zahlreiche andere Beobachtungen mit Erfolg verwendet worden, so vor

Fig. 41.



Pleurosigma angulatum, aufgenommen mit *Leitz*-Objektiv 7.
a Enge Irisblende im Kondensor, genau axial; *b* exzentrisch gestellt; *c* um 60° gegen *b* gedreht;
d um 120° gegen *b* gedreht.

Fig. 42.



Bacillus tumescens.
 Ganz junges fett-
 freies Stäbchen.
 Links: bei normaler
 Einstellung des
 Spiegels; rechts: bei
 unsymmetrischer Be-
 leuchtung.



Bacillus asterosporus.
 Junger Schwärmer
 mit zwei Volutinkugeln.
 Links: bei richtiger
 Beleuchtung, rechts:
 bei unsymmetrischer
 Beleuchtung mit den
 beiden leuchtenden
 Membranpunkten.

allem zu Untersuchungen botanischer Objekte, ferner z. B. der Augenmembranen, des Blutes, des Harnes, von Spinnfasern u. s. w.

Im ganzen wird man jedenfalls sagen können, daß die Dunkelfeldmethoden zunächst als Ergänzung der Färbungs- und Fixierungsmethoden bei Hellfeldbeleuchtung aufzufassen sind, ferner aber, daß sie tatsächlich manches Neue gezeigt haben, was auf andere Weise nicht zu erkennen war. Vor allem hat die Dunkelfeldbeleuchtung den Vorteil, daß man mit ihr die natürlichen lebenden Objekte betrachten kann, nicht nur abgestorbene und durch Chemikalien in irgend einer nicht genauer bekannten Weise veränderte Exemplare. Die Beweglichkeit der lebenden Organismen erleichtert natürlich ungemein ihren Nachweis.

Dunkelfeldbeleuchtung farbiger Präparate und farbige Dunkelfeldbeleuchtung.

Neuerdings hat man die Dunkelfeldmethode auch auf fixierte und gefärbte Ausstrich- und Schnittpräparate angewendet. Dabei zeigen sich, wie zuerst von *F. W. Oelze*¹⁹ und *Erich Hoffmann*²⁰ veröffentlicht wurde, äußerst lebhafte und charakteristische Färbungen, die oft — aber nicht immer — denen bei Hellfeldbeleuchtung komplementär sind. Dadurch kann die Beobachtung weiter erleichtert werden.

Beispiel aus der Spirochätenuntersuchung: Vitales, mit Chinablau gefärbtes Blutpräparat. Die roten Blutkörperchen erscheinen im Dunkelfeld grün, die Spirochäten leuchtend weiß.

Während *F. W. Oelze*, einer Meinung von *Siedentopf* folgend, an Fluoreszenz denkt, ist die von *M. Berek*²¹ gegebene Erklärung, wonach es sich um „selektive Beugung“ handelt, als richtig anzusehen. Demzufolge muß man zur Erzielung ausgesprochener farbiger Phänomene Farbstoffe mit stark ausgeprägter selektiver Absorption bevorzugen und natürlich auch das Einbettungsmedium zweckentsprechend wählen.

Es ergeben sich zwei Möglichkeiten:

a) Wenn die Mikroorganismen die Farbstoffe wenig annehmen, wie z. B. Spirochäten, muß man die „normale“ Beugungswirkung möglichst stark machen, also in Medien von stark abweichendem Brechungsindex einbetten.

b) Sind aber die Organismen selbst beträchtlich mit Farbstoffen durchtränkt, so ist es vorteilhaft, die normale Beugungswirkung durch Einbettung in Medien der gleichen Lichtbrechung möglichst klein zu halten. Dann wird die selektive Beugung überwiegend und der Farbkontrast größer.

Daraus ergibt sich als wichtige Neuerung der Beobachtungstechnik die Anwendung farbigen Lichtes. Geeignet sind nur Filter mit einem oder mehreren möglichst eng begrenzten isolierten Durchlässigkeitsbereichen, die vorteilhaft mit den Absorptionsbereichen der benutzten Farbstoffe zusammenfallen sollen. Bei Doppelfärbung eines Präparates muß das Lichtfilter für denjenigen Spektralbereich, in welchem sich etwa die Absorptionsbänder beider Farbstoffe überlagern, undurchlässig sein.

Außer monochromatischen wird man also auch bichromatische oder sogar polychromatische Filter benutzen.

Beispiel: Spirochäten im Gehirn. Färbung nach *Jahnel*. Bei weißem Licht sind die Spirochäten kaum kenntlich. Bei einem nur blau und rot durchlassenden Filter erschienen die Spirochäten leuchtend rot innerhalb der blau erglänzenden Gehirnmasse.

Wenn es sich um einfach gefärbte Präparate handelt, wird man statt eines Farbfilters den von *M. Berek* und *Felix Jentzsch*²² konstruierten Mikromonochromator benutzen, der aus einem prismatischen Spektrum jede beliebige Farbe auszublenenden gestattet.

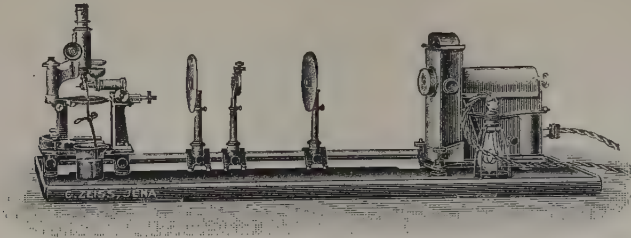
In manchen Fällen, z. B. bei der Untersuchung kolloidaler Lösungen, also auch beim Protoplasma, handelt es sich um ganz anders geartete Objekte, die meist zu klein sind, als daß man noch Aufschlüsse über ihre Form erhalten konnte, bei denen es vielmehr nur darauf ankommt, die Existenz und Zahl von diskreten Teilchen nachzuweisen. Solche Beobachtungen bezeichnet man als Ultramikroskopie. Es lassen sich dabei dieselben Methoden verwenden, wie wir sie bisher besprochen haben, so daß also die Abgrenzung von Dunkelfeldmikroskopie gegen Ultramikroskopie nicht in der Apparatur, sondern im Präparat liegt. Oft genug, z. B. bei der Betrachtung eines einfachen Mundspeichelpräparates wird man gleichzeitig einfache „mikroskopische Beobachtungen bei Dunkelfeldbeleuchtung“ und „ultramikroskopische Beobachtungen“ anstellen können. Die Mundbakterien selbst sind nicht ultramikroskopisch, wohl aber kleine Fett- und Eiweißkügelchen, die sich immer gleichzeitig vorfinden. Sie fallen auf durch ihre zitternde Bewegung und die bei richtiger Einstellung genau konzentrischen Beugungsringe um einen hellen Fleck herum.

Der Apparat, der zuerst als „Ultramikroskop“ bezeichnet wurde, war eine einfache orthogonale Dunkelfeldbeleuchtung, d. h. das beleuchtete Büschel kam senkrecht zur optischen Achse des beobachtenden Mikroskops. Der erste, der nahezu orthogonale Dunkelfeldbeleuchtung verwendete zu dem bewußt ausgesprochenen Zweck, Teilchen zu beobachten, die zu klein waren, um sie unter dem gewöhnlichen Mikroskop zu erkennen, war *J. Dubern*²³ im Jahre 1888. Seine Methode wurde wenig bekannt, so daß das „Ultramikroskop“, mit dem *Siedentopf-Zsigmondy* 1902 an die Öffentlichkeit traten, allgemein als neu überraschte. Und doch war es schon immer bekannt, daß ein eine Flüssigkeit durchsetzendes Lichtbüschel von der Seite her als nahezu leuchtender Kegel zu beobachten ist. Dieser sog. *Faraday-Tyndallsche Lichtkegel* diente schon seit Jahrzehnten in der Chemie als Erkennungsmittel für die Reinheit einer Substanz bzw. der Beimengung kleiner Teilchen. So hat *Faraday* selbst diese diffuse Lichtzerstreuung als Beweis dafür angesehen, daß z. B. in den Goldhydrosolen das Gold nicht „gelöst“, sondern in feiner Verteilung vorhanden sei.

Im April 1900 betrachtete *Zsigmondy* diesen *Faraday-Tyndallschen* Lichtkegel mit der Lupe und einem schwachen Mikroskop, wobei sich die leuchtende Fläche in zahlreiche leuchtende Pünktchen auflöste. *Siedentopf* bildete die *Zsigmondysche* Anordnung nach optischen Prinzipien durch und so entstand das Ultramikroskop nach *Siedentopf-Zsigmondy*²⁴. Die erste Ausführung zeigt Fig. 43. Später hat *Zsigmondy*²⁵ diese Vorrichtung wesentlich verbessert durch Verwendung zweier

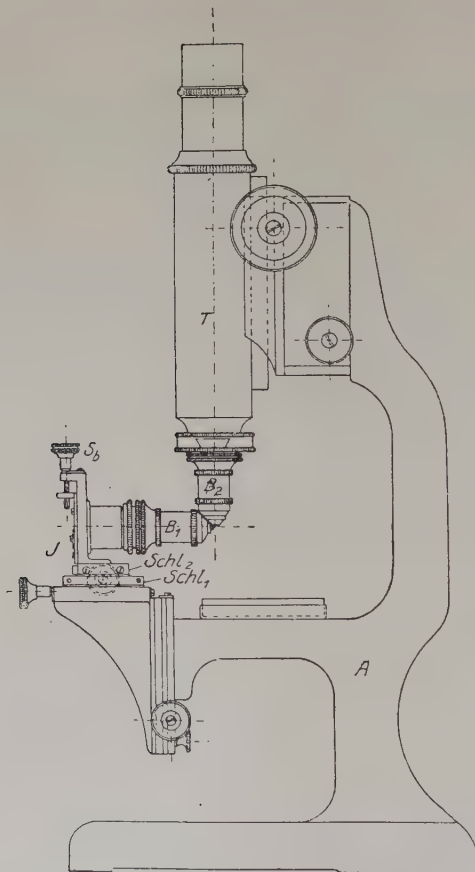
Immersionsobjektive (s. Fig. 44). Die ersten Erfolge ergaben sich bei der Untersuchung kolloidaler Gold- und Silberlösungen. Heut-

Fig. 43.



Spaltultramikroskop von Siedentopf-Zsigmondy.

Fig. 44.



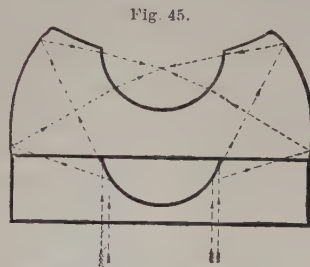
Immersionultramikroskop von Zsigmondy.

zutage wird diese Anordnung zwar noch für die Untersuchung fester Körper (z. B. Rubingläser) benutzt, doch hat sich für Flüssigkeiten die

koaxiale Anordnung der Spiegelkondensoren als besser erwiesen. Dabei werden auf diese Kondensoren Kammern aufgesetzt, durch die die zu verwendende Flüssigkeit durchfließt. Solche Kammern sind von *C. Metz* (*Leitz*) 1905²⁶, von *H. Siedentopf* (*Zeiß*) 1910¹¹ und von *O. Heimstädt* (*Reichert*) 1912²⁷ angegeben worden.

Zur Dunkelfeldbeobachtung von hängenden Tropfen hat *F. W. Oelze*²⁸ neuerdings eine Beobachtungskammer angegeben, die von *C. Zeiß* hergestellt wird.

Vom Verfasser wurde der Hohlraum für die Untersuchungssubstanz gleich in den Spiegelkondensor eingeschliffen und dieser selbst zweckentsprechend ungeändert. So entstand der Ultrakondensor von *Jentzsch*²⁹, mit dessen Hilfe sich Gase und Flüssigkeiten direkt



Strahlenverlauf im Ultrakondensor
von *Jentzsch*.

untersuchen lassen, ohne daß ein Präparat gemacht werden müßte (s. Fig. 45).

Die Grenze zwischen Mikronen und Ultramikronen ist naturgemäß nicht scharf. Diese beiden Bezeichnungen trennen vielmehr nur gewisse typische Größenklassen. Immerhin wird man gemäß der *Abbe-Helmholtz*schen Beziehung Teilchen, deren Lineardimensionen kleiner als etwa $0.2 \mu = 200 \mu\mu$ sind, als ultramikroskopisch in dieser Richtung bezeichnen müssen. Übrigens ist es ein recht häufiger Fall, daß man mit Partikeln zu tun hat, die bei einer nadelförmigen Gestalt nur in einer Querdimension ultramikroskopisch sind, in der Längsrichtung aber oberhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskopes liegen. Das gilt z. B. für die meisten Spirochäten. Die Sichtbarkeit derartiger Objekte zeigt, wie schon oben besprochen, eine starke Abhängigkeit vom Azimut der Beleuchtung. Nadelförmige Teilchen, die nicht genau in der Objektebene liegen, sondern deren Längsachse einen Winkel mit der Einstellenebene bildet, werden deshalb beim Drehen des Präparates, selbst dann, wenn die Beleuchtung ganz genau zentrisch ist, Schwankungen der Helligkeit aufweisen. Durch Aufsuchen des Maximums der Helligkeit gelingt es, aus einfachen trigonometrischen Beziehungen die Lage solcher Nadeln im Raume festzuhalten. Näheres darüber haben *H. Sieden-*

*topf*³⁰ und vor allem *C. Maey*³¹ veröffentlicht, der auch leicht zu wiederholende Messungen an der Radiolarie *Aulocantha* anstellte.

Während also eine obere Grenzé des ultramikroskopischen Gebietes sich ungefähr angeben läßt, kann man eine untere Grenze überhaupt nicht begrifflich festlegen. Die Erweiterung des uns zugänglichen Gebietes ist lediglich eine Intensitätsfrage. Will man die Grenze möglichst herabdrücken, muß man einerseits die Wahrnehmungsschwelle unseres Auges, bzw. der photographischen Platte herabdrücken, anderseits die objektive Intensität des von einer Partikel emittierten Lichtes vergrößern. Diese letztere ist, abgesehen von den Eigenschaften des Teilchens selbst, bekanntlich proportional dem Quadrate der Apertur des beleuchtenden und des beobachtenden Strahlenbüschels und ferner der Intensität der ursprünglichen Lichtquelle. Der günstigste Fall tritt ein, wie Verfasser schon 1910 zeigte¹², wenn die beiden Aperturquadrate einander gleich sind. Eine Vergrößerung dieser Faktoren tritt ein, wenn das Einbettungsmedium höhere Brechung erhält, ist also nur in sehr engen Grenzen möglich. Um die Intensität der Lichtquelle möglichst auszunutzen, muß man die unvermeidlichen Verluste durch Reflexion und Absorption möglichst verkleinern. Die größte Intensität, die uns zur Verfügung steht, hat immer noch die Sonnenstrahlung, der das elektrische Bogenlicht, unsere intensivste irdische Lichtquelle, bedeutend nachsteht. Vielleicht gelingt es, mit Hilfe der *Lummerschen* Sonnenlampe (Kohlelichtbogen unter Druck) weiter zu kommen.

Die Eigenschaften der Ultramikronen selbst treten in zweierlei verschiedenen Weisen auf. Bezüglich der physikalischen Eigenschaften eines Partikels dürfte ohneweiters einleuchten, daß umsoweniger Licht an ihm abgelenkt wird, je ähnlicher die optischen Konstanten der beiden Medien einander sind. Sind sie im Grenzfall einander gleich, so hat man nur ein optisch homogenes Medium vor sich. Man wird also im allgemeinen erwarten müssen, die kleinsten Partikel in solchen Präparaten wahrzunehmen, wo die Differenz der optischen Konstanten (d. h. Brechungsindex und Absorptionskoeffizient) von disperser Phase und Lösungsmittel möglichst groß ist. In der Tat hat man die bisher kleinsten Ultramikronen in kolloidalen Goldlösungen gefunden. Da sowohl das Lösungsmittel wie die disperse Phase optisch dispergieren, findet man die größte Differenz der Brechungsindices bei einer ganz bestimmten Farbe, bei der die Sichtbarkeit von Ultramikronen am besten sein wird. Das ist zuerst von *W. Ostwald*³² veröffentlicht worden. Eine Veröffentlichung des Verfassers über diese von ihm als *Farbfeldbeleuchtung* bezeichnete und schon seit 1914 angewandte Methode befindet sich seit längerer Zeit in Vorbereitung. Zum schnellen Finden der passenden Farbe benutzt man vorteilhaft den Mikromonochromator des Verfassers²².

Außerdem kommen die geometrischen Dimensionen der Partikel in verwickelter Weise auch dann in Betracht, wenn

es sich um kugelförmige Gebilde handelt. Geht man ständig zu kleineren Radien über, so wächst, wenn man von mikroskopischen Dimensionen ausgeht, die emittierte Lichtmenge zunächst schnell, dann langsam, um weiterhin wieder abzunehmen, bis dann endlich bei ganz kleinen Partikeln überhaupt keine merkliche Lichtmenge mehr abgelenkt wird. Das Maximum liegt ungefähr bei Durchmessern von $150\ \mu\mu$, hängt aber seinerseits wieder von dem Material ab. Außerdem tritt ein starker Einfluß der Wellenlänge zutage, da blaue Strahlen in viel höherem Maße abgelenkt werden, als rote. Bekanntlich hat schon 1879 Lord *Rayleigh* auf diese Weise die blaue Farbe des Himmelslichtes erklärt.

Optische Methoden zur Größenbestimmung submikroskopischer Partikel.

Man kann aus der Farbe des abgelenkten Lichtes richtige Rückschlüsse auf die Größe des beugenden Teilchens ziehen, natürlich streng nur dann, wenn man sein Material und dessen optische Konstanten kennt. Diese Methode ist zuerst von *F. Ehrenhaft*³³ angegeben und von *G. Laski*³⁴ weiter ausgebildet worden. Als Beispiel gebe ich eine Tabelle von Silberteilchen:

Farbe	Radius
orange	über $100\ \mu\mu$
orangegelb	90—100 „
gelb	75—90 „
gelbgrün	70—75 „
grün	60—70 „
blau	50—60 „
violett	40—50 „

Mit unseren gegenwärtigen Hilfsmitteln gelingt es noch, Ultramikronen von etwa $4\ \mu\mu$ Durchmesser nachzuweisen. Man nähert sich damit schon stark den Dimensionen der Moleküle selbst, die bei hochwertigen organischen Substanzen ja recht große Werte annehmen können. So berechnet sich für das Molekül der löslichen Stärke ein Durchmesser von $5\ \mu\mu$, für Chloroform von ca. $0.8\ \mu\mu$ u. s. w.

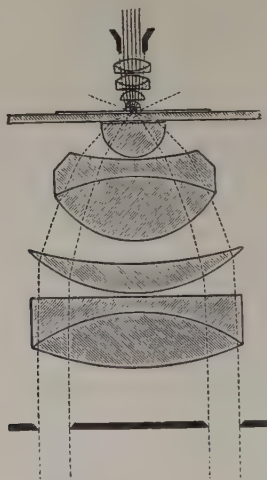
Wegen einer ganzen Reihe von interessanten Erscheinungen, die man beim Gebrauch des Ultramikroskops wahrnehmen kann, vor allem wegen der sog. *Brownschen* Molekularbewegung muß auf die physikalische Literatur verwiesen werden.

Neben der Dunkelfeldbeleuchtung durch Spiegelkondensoren hat sich die Verwendung von Linsen Kondensoren mit Zentralblende erhalten. Obwohl man hier wegen der erwähnten Verschleierung nie so gute Kontraste wie mit den Spiegelkondensoren erhalten kann, ist doch für viele Zwecke, namentlich wenn es sich darum handelt, schnell von der einen Beleuchtungsart zur anderen überzugehen, ein Linsen Kondensor durchaus zu empfehlen.

Man legt dazu auf den Diaphragmenträger des *Abbeschen* Beleuchtungsapparates eine Zentralblende, wie sie schon *Abbe* selbst beschrieben

hat³⁵, d. h. einen schmalen Ring, der mittels drei dünnen Stäbchen eine zentrale Blendscheibe trägt. Wesentlich bessere Resultate als mit einem einfachen zwei- oder dreilinsigen Kondensor erzielt man mit einem achromatischen und aplanatischen Kondensor, wie ihn *C. Metz*³⁶ beschrieben hat (s. Fig. 46). Dieser Kondensor weist denselben Korrektionszustand wie ein Immersionsobjektiv auf und eignet sich tatsächlich in hervorragendem Maße zur Dunkelfeldbeleuchtung, namentlich dann, wenn

Fig. 46



Achromatischer und aplanatischer
Kondensor von *C. Metz*.

ein etwas größeres Gesichtsfeld betrachtet werden soll. Er bietet noch den weiteren Vorteil, daß man in einfachster Weise verschiedene Aperturbereiche zur Beleuchtung aussuchen kann.

Literatur: ¹ *H. v. Helmholtz*, Über die Grenzen der Leistungsfähigkeit der Mikroskope. Berl. Akad. d. Wiss. 20. Okt. 1873; Poggendorfs Ann. Jubelband 1874, S. 557—584. — ² *E. Abbe*, Beiträge zur Theorie des Mikroskopes und der mikroskopischen Wahrnehmung. W. Schulzes A. f. mikrosk. Anat. 1873, IX, S. 413—468. — ³ *O. Lummer* u. *Fr. Reiche*, Die Lehre von der Bildentstehung im Mikroskop von Ernst Abbe. Braunschweig 1910. — ⁴ *M. v. Laue*, Zur Theorie der optischen Abbildung. Ann. d. Phys. 1914, XLIII, S. 165—168. — ⁵ *A. Köhler*, Eine mikrophotographische Einrichtung für ultraviolett Licht. Physik. Zt. 1904, V, S. 666—673. — ⁶ *F. H. Wenham*, On the illumination of transparent microscopic objects on a new principle, read 17 Avril 1850 (Trans. Micr. Soc. London 1852). III, S. 83—90. — ⁷ *H. Siedentopf*, Über die physikalischen Prinzipien der Sichtbarmachung ultramikroskopischer Teilchen. Berl. klin. Woch. 1904, Nr. 32; Paraboloidkondensor. Zt. f. wiss. Mikr. 1907, XXIV, S. 104—108. — ⁸ *C. Reichert*, Über einen neuen Spiegelkondensor zur Sichtbarmachung ultramikroskopischer Teilchen. M. med. Woch. 1906, Nr. 51. — ^{8a} *O. Heimstädt*, Neuerungen an Spiegelkondensoren. Zt. f. wiss. Mikr. 1907, XXIV, S. 236—242. — ⁹ *J. W. Stephenson*, A Catoptric immersion illuminator. J. Roy. Micr. Soc. London 1879, II, p. 36/37. — ¹⁰ *W. v. Ignatowsky*, Ein neuer Spiegelkondensor. Zt. f. wiss. Mikr. 1908, XXV, S. 64—67. — ¹¹ *H. Siedentopf*, Über einen neuen Fortschritt in der Ultramikro-

skopie (Kardioidkondensor). Verh. d. Deutsch. phys. Ges. 1910, XII, S. 6—47. —
¹² *Felix Jentzsch*, Über Dunkelfeldbeleuchtung (Der konzentrische Dunkelfeldkondensor). Verh. d. Deutsch. phys. Ges. 1910, XII, S. 975—991; Physik. Zt. 1910, XI, S. 993—1000. — ¹³ *Landsteiner u. Mucha*, Zur Technik der Spirochätenuntersuchung. Wr. klin. Woch. 1906, Nr. 45. — ¹⁴ *N. Gaidukow*, Dunkelfeldbeleuchtung und Ultramikroskopie in der Biologie und in der Medizin, bei Gustav Fischer 1910. — ¹⁵ *Molisch*, Bot. Ztg. 1908, S. 136. — ¹⁶ *Arthur Meyer*, Notiz über das Aussehen der Bakterien im Ultramikroskop. A. f. Protistenkunde 1911, XXIV, S. 76—79. —
¹⁷ *H. Siedentopf*, Über das Auflösungsvermögen der Mikroskope bei Hellfeld- und Dunkelfeldbeleuchtung. Zt. f. wiss. Mikr. 1915, XXXII, S. 1—42. — ¹⁸ *A. Cotton u. H. Mouton*, Les ultramicroscopes et les objets ultramicroscopiques. Masson et Cie., Paris 1906. — ¹⁹ *F. M. Oelze*, Über Fluoreszenzfärbung von Spirochäten im vital gefärbten Dunkelfeldpräparat. M. med. Woch. 1920, LXVII, S. 1354. — ²⁰ *Erich Hoffmann*, Berl. klin. Woch. 1921, S. 73 u. 154. — ^{20a} *Egon Keining*, Über die Benutzung des Hoffmannschen Leuchtbildverfahrens zum Studium von Mikroorganismen u. s. w. M. med. Woch. 1921, LXVIII, S. 131. — ²¹ *Max Berek*, Die optischen Grundlagen für die Sichtbarmachung gefärbter Mikroorganismen im Dunkelfeld. Berl. klin. Woch. 1921, S. 740. — ²² *M. Berek u. F. Jentzsch*, Ein kleiner lichtstarker Mikromonochromator, besonders für mikroskopische Beobachtungen. Zt. f. Instrumentenkunde 1914, XXXIV, S. 47—51. — ^{22a} *F. Jentzsch*, Ein lichtstarker Mikromonochromator. Eders Jahrb. d. Photogr. 1914, XXVIII, S. 88—90. — ²³ *G. Duvern*, Indian Engineering 1888, April 7, 14, 21; vgl. *C. V. Raman*, Historical note on the Discovery of the ultramicroscopic method. Phil. Mag. 1909, XVII, p. 495. — ²⁴ *H. Siedentopf u. R. Zsigmondy*, Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen. Ann. d. Phys. 1903, X, S. 1—39. — ²⁵ *R. Zsigmondy*, Über ein neues Ultramikroskop. Physik. Zt. 1913, XIV, S. 975—979. — ²⁶ *C. Metz*, Die Leitzsche Dunkelfeldbeleuchtung bei Verwendung der homogenen Ölimmersion. Zt. f. wiss. Mikr. 1905, XXII, S. 114—118. — ²⁷ *O. Heimstädt*, Eine Kammer zur Sichtbarmachung der Brownschen Molekularbewegung in Luft und Gasen. Mikrokosmos 1912, VI, S. 129/130. — ²⁸ *F. W. Oelze*, Beobachtungskammer für Mikroorganismen und Blutkörperchen im ruhenden Medium für Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung. M. med. Woch. 1921, LXVIII, S. 130. — ²⁹ *F. Jentzsch*, Der Ultrakondensor. Ein neuer Apparat für ultramikroskopische Untersuchungen. Verhandl. d. phys. Ges. 1910, XII, S. 991—993; Physikalische Zeitschrift 1910, XI, S. 1000—1001. — ³⁰ *H. Siedentopf*, Die Sichtbarmachung von Kanten im mikroskopischen Bilde. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie 1908, XXV, S. 424—431; Über ultramikroskopische Abbildung linearer Objekte. Zt. f. wiss. Mikr. 1912, XXIX, S. 1—47. — ³¹ *E. Maey*, Die räumliche Lagerung von Kanten im mikroskopischen Objekt bei Dunkelfeldbeleuchtung. Zt. f. wiss. Mikr. 1912, XXIX, S. 48—57. — ³² *W. O. Ostwald*, Über die theoretische Möglichkeit einer Chromoultramikroskopie. Zt. f. Chem. u. Ind. d. Kolloide 1912, XI, S. 290 bis 294. — ³³ *F. Ehrenhaft*, Ein optischer Weg zur Größenbestimmung mikroskopisch nicht mehr meßbarer Einzelpartikel. Physik. Zt. 1914, XV, S. 952. — ³⁴ *G. Laski*, Größenbestimmung submikroskopischer Partikel aus optischen und mechanischen Effekten. Ann. d. Phys. 1917, LIII, S. 1—26. — ³⁵ *E. Abbe*, Über einen neuen Beleuchtungsapparat am Mikroskop. M. Schulzes A. f. mikr. Anat. 1873, IX, S. 469—480. Ges. Abh. I, S. 100—112. — ³⁶ *C. Metz*, Der aplanatische und achromatische Kondensor. Zt. f. wiss. Mikr. 1912, XXIX, S. 553—562. — ³⁷ *L. Arzt*, Spiegelkondensor mit direkter Beleuchtung. Wr. klin. Woch. 1920, Nr. 18.

Die als Leuchtbildmethode bezeichnete Art der Dunkelfelduntersuchung.

Von Prof. Dr. **Erich Hoffmann**, Bonn.

Mit 1 farbigen Tafel.

Als Leuchtbildmethode wurde von mir die Dunkelfelduntersuchung gefärbter Ausstriche und Schnitte beschrieben und mit einem eigenen Namen belegt, weil diese Untersuchungsart für verschiedene wissenschaftliche und praktische Zwecke vorteilhaft erschien. Diese Methode, welche mit den einfachsten Mitteln von jedem, der eine Dunkelfeldvorrichtung besitzt, angewandt werden kann, ist auch früher schon gelegentlich in weniger vollkommener Form versucht worden, hat sich aber als eigene Untersuchungsmethode nicht durchzusetzen vermocht und war bei ihrer ersten Demonstration in Bonn (13. Dezember 1920) und Berlin (5. Januar 1921) hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit nicht bekannt.

Schon im Jahre 1893 hat *Amann* das Aufleuchten von Tuberkelbacillen bei hellster Beleuchtung durch zentrale Abblendung an mit Fuchsin gefärbten Präparaten bemerkt. Auch *Siedentopf* hat schon 1908 auf die Verdickung gefärbter Spirochäten im Dunkelfeld aufmerksam gemacht. Später hat *Arning* von im Dunkelfeld aufleuchtenden nach *Giemsa* gefärbten Syphilisspirochäten Mikrophotogramme hergestellt und diese demonstriert. *P. Schmidt* hat die gleiche Methode zur Untersuchung der Körnelung von Erythrocyten benutzt. Ferner hat *F. W. Oelze* über Färbungen im Dunkelfeld berichtet und vor allem die Betrachtung vital mit Chinablau gefärbter Dunkelfeldpräparate empfohlen, während er die Untersuchung gefärbter Ausstrichpräparate für weniger brauchbar erklärte. Ungefärbte Flächenpräparate von Chromatophoren der Reptilien- und Amphibienhaut hat *W. J. Schmidt* in meinem Laboratorium im Dunkelfeld untersucht, während *Arning* die Methode zur Unterscheidung von Zinnober- und Kohlepartikelehen in Schnitten herangezogen hat. Alle diese Versuche blieben aber unbeachtet und führten nicht zu einem praktisch brauchbaren, einfachen Verfahren, dessen Leistungsfähigkeit neben den anderen Methoden Anerkennung finden konnte.

Zunächst waren es die Verunreinigungen des Grundes durch aufleuchtende Körnchen, welche die zu beobachtenden beugenden Elemente

zu stark überstrahlten, und das durch Azimutfehler bedingte zerhackte Aussehen der Präparate, die der Methode schädlich waren und neben der durch vermindertes Auflösungsvermögen bedingten Unvollkommenheit des optischen Bildes, wie sie z. B. bei Gonokokken bemerkbar ist, ihr die Einführung in die Praxis verwehrten. Besonders bei Schnitten leuchteten alle möglichen Bestandteile des Gewebes in einer Weise auf, daß ein brauchbares Bild bestimmter kleinster Elemente, wie Bakterien und Spirochäten, schwer erreichbar erschien. Da zeigte ich, daß durch einen ungemein einfachen Kunstgriff, nämlich die Einschaltung einer *Mattscheibe* zwischen *Dunkelfeldlampe* und *Mikroskopspiegel*, die störenden Bildpunkte des Ausstrich- oder Gewebsgrundes ausgeschaltet werden können, so daß Bakterien, Pilze, Spirochäten u. s. w. helleuchtend auf dunklem oder anders gefärbtem Grund hervortreten. Die Schönheit, Klarheit und Leuchtkraft der so gewonnenen Bilder überraschte allgemein und verschaffte der Methode bald Anerkennung.

Die Wirkung der *Mattscheibe* beruht darauf, daß

1. die Überstrahlung der beugenden Elemente durch die diffuse Aufhellung des Untergrundes beseitigt wird;

2. die Lichtquelle künstlich vergrößert wird, indem an Stelle des kleinen Lichtkraters der Lampe ein größerer heller Lichtkreis der *Mattscheibe* tritt und dadurch eine größere Stelle des Präparates gleichförmig erleuchtet wird;

3. die Azimutfehler weitgehend ausgeschaltet werden.

So einfach die Methode aber auch ist, kann sie doch, wie die Erfahrung lehrt, selbst geübten Mikroskopikern Schwierigkeiten bereiten, solange nicht die günstigste Beleuchtung und Modifikation des Lichtes durch *Mattscheibenwirkung* herausgefunden ist. Deshalb ist es wichtig, die Einzelheiten des Verfahrens genau darzustellen.

Als Lichtquelle hat sich die *Leitzsche Liliputbogenlampe* mit Uhrwerk vorzüglich bewährt; auch die *Zeißsche Lampe*, die dieser ähnlich ist, kann an ihrer Stelle benutzt werden. Wichtig ist, daß die Lampe richtig angeschlossen wird (positive und negative Pole beachten!) und der Lichtkegel des dickeren Kohlenstabes den Planspiegel des Mikroskops möglichst in voller Ausdehnung beleuchtet und erhellt. Als *Dunkelfeldsysteme* haben sich die neuen Instrumente der Firmen *Zeiß* und *Leitz* trefflich bewährt. Sowohl der *Paraboloidkondensor* von *Zeiß*, wie der *Spiegelkondensor* von *Leitz* geben ein ausgezeichnetes Dunkelfeld; an ihrer Stelle können die *Hell-dunkelfeldkondensoren* (auch die *Wechselkondensoren*) beider Firmen benutzt werden, die durch einfache Umstellung eines Hebels abwechselnde Betrachtung im Hellfeld und Dunkelfeld gestatten. Als *Zeißsche Systeme* sind die Objektive A und DD (letzteres mit Einhängeblende) sowie die Immersion X in Verbindung mit den neuen *Kompensationsokularen* 4 und 12 in erster Linie empfehlenswert. Das

Präparat wird wie bei der gewöhnlichen Dunkelfelduntersuchung, die an anderer Stelle eingehend beschrieben ist, auf den mit Immersionsöl bedeckten Dunkelfeldkondensor vorsichtig aufgelegt, wobei Luftblasen sorgsam zu vermeiden sind. Dann wird es zunächst mit schwacher Vergrößerung betrachtet und das Dunkelfeld ohne Mattscheibe an einem geeigneten Testpräparat (Syphilisspirochäten oder Tuberkelbacillenpräparat) möglichst günstig eingestellt. Schon hierbei sieht man Spirochäten und Bacillen aufleuchten und kann durch Einschieben der Mattscheibe einen günstigeren dunklen Untergrund erzielen und die geeignetsten Stellen aussuchen. Alsdann stellt man mit Immersion ein, wobei wieder ohne Mattscheibe zunächst die kontrastreichste Dunkelfeldbeleuchtung gesucht wird; als Okular empfiehlt sich am meisten Komp. Ok. 12. Das körnige und wie zerhackte Bild wird nun mit einem Schlage rein und deutlich durch Einschaltung der Mattscheibe, die am besten zur Hälfte mit Öl bestrichen wird, da für Ausstriche der geölte, für Schnitte der nicht geölte Teil meist besser verwendbar ist und kontrastreichere, bzw. hellere Bilder mit möglichst reinem und abgedunkeltem Grund ergibt. Wichtig ist es aber stets, erst ohne Mattscheibe die bestmögliche hellste Beleuchtung zu suchen, wobei auf gute Ausnutzung der Lampe (heller Krater der dickeren oberen Kohle, günstige Entfernung vom Mikroskopspiegel, der möglichst ganz belichtet sein soll) stets sorgsam zu achten ist; nur dann erhält man wirklich brauchbare und ungemein schöne Bilder. An Stelle des Objektives X kann auch die Ölimmersion $\frac{1}{12}$ von Zeiß mit passender Einhängeblende benutzt werden.

Neuerdings hat die Firma Leitz ihre Dunkelfeldeinrichtungen so verbessert, daß sie für das Leuchtbildverfahren leichter verwendbar sind und Hervorragendes leisten. Als Vorzug der neuen Optiken gegenüber den älteren muß die gute Zentrierung sowohl des Dunkelfeld- als auch des Helldunkelfeldkondensors hervorgehoben werden, wodurch die Handhabung für den Untersucher viel bequemer geworden ist. Das in der Praxis beliebte Stativ C kann ohneweiters für die neuen Kondensoren benutzt werden. Die Technik der Untersuchung im Leuchtbild ist dieselbe wie bei den Zeiß-Optiken. Die Bilder sind gleichmäßig hell, scharf und frei von Azimutfehlern. Durch Heben und Senken des Beleuchtungsapparates, ferner durch Variieren der Tubuslänge, kann man bequem geringe Fehler in der Objektträgerdicke kompensieren, ebenso bei Verwendung schwacher Vergrößerungen in Kombination mit der Mattscheibe die Helligkeit im ganzen Gesichtsfeld gleichmäßig gestalten. Die Handhabung des Helldunkelfeldkondensors ist etwas unständlicher wie bei der Zeiß-Optik, weil man zwei Hebel bedienen muß, dafür aber ist das Hellfeld auch besonders gut. Die Immersion $\frac{1}{12}$ wird mit Trichterblende, resp. mit auswechselbarem Objektivansatz benutzt, in gleicher Weise die neue Fluoritölimmersion $\frac{1}{7,2}$, bei der der Abstand von der Objektivfläche größer, dementsprechend abgesehen von anderen

Fig. 1.



Syphilisspirochäte im Ausstrich.

Fig. 2.



Gelbsuchtspirochäte im Ausstrich.

Fig. 3.



Gelbfieberspirochäte im Schnitt.

Fig. 4.



Tuberkelbacillen im Ausstrich.

Vorteilen die Handhabung für den im Mikroskopieren weniger Geübten vereinfacht ist. Die geringere Vergrößerung, die durch dieses Objektiv erzielt wird, läßt sich vorzüglich kompensieren durch die neuen Periplanokulare (Periplanate), von denen Nr. 12 sich am besten eignet. Damit erhält man bis in die äußerste Peripherie gleichmäßig scharfe Gesichtsfelder, ein Vorteil, der nicht allein dem mikroskopierenden Auge Erleichterung im Überschauen der Details verschafft, sondern auch der Photographie zustatten kommt.

Nach Dr. *Berek*, der systematische Untersuchungen über die Farbenphänomene im Dunkelfeld an gefärbten Präparaten angestellt hat, beruhen diese auf selektiver Beugung, die nach Maßgabe der selektiven Absorption und Brechung erfolgt. Es werden daher für die Auswahl der Färbung solche Farbstoffe zu bevorzugen sein, welche scharfe Absorptionsstreifen im Spektrum aufweisen. Benutzt man zwischen Bogenlampe und Mikroskopspiegel ein solches Lichtfilter, welches eine auswählende Durchlässigkeit nur für diejenige Farbe besitzt, für welche die Farbstofflösung des Präparates maximal absorbierend ist, so ist es möglich, den höchsten Farbkontrast im Dunkelfeld zu erreichen. So kann man, wie Dr. *Berek* gezeigt hat, an Tuberkelbacillenpräparaten, die in üblicher Weise mit Carbofuchsin und Methylenblau gefärbt sind, durch Anwendung eines Blaufilters die Tuberkelbacillen allein deutlich sichtbar machen, während der sputumhaltige Untergrund vollkommen ausgelöscht wird; auch bei Sporen- und Geißelfärbung gelingt es, durch Anwendung geeigneter Farbfilter diese Gebilde unterschiedlich gegenüber den vegetativen Teilen der Mikroorganismen hervorzuheben; ebenso lassen sich bei silbergefärbten Spirochäten eigenartige Farbphänomene erzeugen. Diese Farbfilter-Leuchtbildmethode verdient weiter ausgebaut und daraufhin geprüft zu werden, ob das Blau-, Rot-, Grünfilterleuchtbild u. s. w. auch neue Befunde zu erheben gestattet.

Der Name „Leuchtbildmethode“ ist von einzelnen Autoren als nicht besonders glücklich empfunden worden (z. B. *Berek*). Die kurze Bezeichnung „Leuchtbild“ erscheint mir aber doch brauchbar und gerechtfertigt, wenn man berücksichtigt, daß sie nichts über Selbstleuchten und Fluoreszenz besagen soll und gerade deshalb an Stelle der *Oelzeschen* Benennung „Fluoreszenzfärbung“ gesetzt worden ist. Die eigenartige Erscheinung, daß rotgefärbte Mikroorganismen grün, blaugefärbte braungelb, also in der Komplementärfarbe aufleuchten, die zuerst an Fluoreszenzphänomene denken ließ und analog der Erscheinung ist, daß Methylenblau in Lösung blau, in krystallinischer Form bräunlich, Fuchsin gelöst rot, in Trockensubstanz grünlich aussieht, beruht ja nach Ansicht der Physiker nicht auf Fluoreszenz, sondern ist durch eigenartige Beugungsvorgänge an den kleinsten Elementen zu erklären. *Berek* hat sie in letzter Zeit genauer untersucht

und, wie bereits oben erwähnt, auf selektive Beugung zurückgeführt; ihm verdanke ich auch obige Erklärung der günstigen Einwirkung der Mattscheibe, die ich schon bei Dunkelfelduntersuchungen lebender Spirochäten vielfach erprobt hatte.

Die Leuchtbildmethode hat sich bisher für eine Anzahl von Mikroorganismen trefflich bewährt. Vor allem können spärliche Spirochäten und Tuberkelbacillen leichter und schneller gefunden werden und lassen sich auch Ungeübten z. B. beim Unterricht ungemein deutlich und scharf demonstrieren. Selbst in abgeblästen alten *Giemsa*-Präparaten gelingt es Syphilis-, Gelbsucht- und Gelbfieberspirochäten ebenso wie die feinsten Wasser- und Mundspirochäten leicht aufzufinden; ebenso kann man schwer färbbare Spirochäten schon bei leichter Anfärbung gut sichtbar machen. Auch für Geißeln von Bakterien hat *M. Ficker* die Vorteile der Methode hervorgehoben; diese sind im Dunkelfeld gut erkennbar, wenn sie im Hellfeld nicht oder kaum zu sehen sind; selbst eine minimale Anfärbung genügt schon, um sie deutlich bemerkbar zu machen; auch sollen sich Typhus- und Kolibacillen dabei unterscheiden lassen.

Die Überlegenheit der Leuchtbildmethode über die Hellfelduntersuchung ist auch durch sorgfältige Auszählungen in verschiedenen Laboratorien bereits klargestellt worden; außer in meinem Laboratorium, wo von Anfang an die mehrfache Anzahl der Mikroorganismen in kürzerer Zeit gefunden werden konnte, sind solche Untersuchungen für Tuberkelbacillen auch im Laboratorium von Prof. *Paul Krause* und von *Silberstein* aus der *Scholtz*schen Klinik mit bestem Erfolg gemacht worden; in einzelnen Präparaten wurde die 3—6fache Anzahl der Keime gefunden. Auch für die Färbung in dicken Tropfen (*Mühlens*) ist das Verfahren verwendbar. Von den Färbungen, welche sich für Ausstriche bisher bewährt haben, seien hier genannt:

1. Die *Giemsa*-Färbung in ihrer gewöhnlichen Ausführung.
2. Die Schnellfärbung mit *Giemsa*-Lösung nach *Preis*, die schon bei 1—2maliger Erwärmung brauchbare Bilder erzielen läßt.
3. Die Osmium-*Giemsa*-Tanninmethode (Ausstriche auf osmierten Objektträgern, die vor und sogleich nach dem Ausstrich in eine Osmiumkammer gestellt werden, werden mit *Giemsa*-Lösung kräftig gefärbt und später mit 25—30%iger wässriger Tanninlösung differenziert), die ganz ausgezeichnete Leuchtbilder erreicht.
4. Die Färbung nach *Shamaine* (Auftropfen von zehn Tropfen 1%iger Kalilauge, in die 10 Tropfen wässriger Fuchsinlösung [1 konzentrierte alkoholische Fuchsinlösung + 20 Aqua dest.] hineingetropft werden. Abspülen nach 3—4 Minuten), die schöne Bilder von *Spirochaeta pallida* u. a. gibt.
5. Die Carbofuchsin-Methylenblaumethode, wie sie für säurefeste Bakterien üblich ist.

Neben diesen Methoden, welche in der Dermatologischen Zeitschrift XXXIII, Heft 1/2 genauer beschrieben sind, können auch viele andere mit Vorteil benutzt werden. Auch für Schnitte ist die Leuchtbildmethode gut brauchbar, wenn sie einigermaßen geeignete Dicke haben und passend gefärbt sind; auch in ihnen macht sie selbst feinste Spirochäten und Bakterien ausgezeichnet sichtbar, wie für Syphilis-, Gelbsucht- und Gelbfieberspirochäten sich leicht nachweisen läßt. Aber auch andere kleinste Elemente, wie Pigmentkörnchen, Kalkstäubchen, andere Granula u. s. w. treten deutlich hervor. Natürlich hat die Methode ihre Grenzen und leistet oft weniger als beste Hellfeldbeleuchtung; sie muß daher mit Kritik angewendet werden. In bezug auf Einzelheiten muß ich auf meine und meiner Schüler Arbeiten verweisen.

Für die Zukunft kommt es darauf an, ob es gelingt, Färbemethoden zu finden, welche noch unbekannte kleinste Mikroorganismen so imprägnieren, daß sie im Leuchtbild mit besonderer Färbung gegenüber dem Untergrund hervortreten; das Beispiel der feinen Gelbfieberspirochäten und allerfeinster kaum gefärbter Geißeln legt die Möglichkeit nahe, daß es auf diesem Wege gelingt, auch eine oder die andere Art der sog. ultravisiblen Erreger dem Auge zugänglich zu machen. Jedenfalls ist dies ein Weg, den die Forschung künftig beschreiten kann, zumal neben der Mattscheibe nun auch farbige (rote, blaue, grüne u. s. w.) Filter angewandt werden können, um störende Erscheinungen des Untergrundes sowohl in Ausstrichen wie in Schnitten auszulöschen. Die Tatsache, daß man auf diese Weise auch Granula und Sporen in Bakterien allein oder in besonderer auffallender Farbe aufleuchtend darstellen kann (z. B. Granula von Tuberkelbacillen, Körnchen in Leptothrixfäden, Sporen verschiedener Art), muß Anlaß geben, diesen Weg weiter zu verfolgen.

Nach alledem bedeutet die Leuchtbildmethode einen Fortschritt für Unterricht und Forschung und ihre Vorteile lassen sich zurzeit etwa in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1. Die Leuchtbildmethode gibt in gefärbten Ausstrichen und Schnitten oft ein deutlicheres Bild von Spirochäten, Bakterien und anderen kleinsten Gebilden, die auch im Hellfeld gut sichtbar sind.

2. Sie läßt im Hellfeld nur schwach oder gar nicht wahrnehmbare Keime u. s. w. bei bestimmten Färbungen deutlich leuchtend hervortreten und eignet sich deshalb zur Demonstration derselben vorzüglich.

3. Sie gestattet, feinste Fädchen, wie Bakteriengeißeln, auch bei schwacher Anfärbung (Minimalfärbung) und Geißeln in alten, für Hellfelduntersuchung unbrauchbar gewordenen Präparaten oft noch deutlich zu erkennen.

4. Das Aufleuchten dieser kleinsten Gebilde in der Komplementärfarbe beruht nicht auf Fluoreszenz, sondern eigen-

artigen Beugungserscheinungen (selektiver Beugung nach *Berek*).

5. Bei Auffindung differentieller Färbemethoden kann die Methode vielleicht zur Sichtbarmachung sog. ultravisibler Virusarten nutzbar gemacht werden, zumal wenn die Auslöschung störender Erscheinungen des Untergrundes außer durch die Mattscheibe auch durch Farbfilter versucht wird.

6. An Stelle des *Zeißschen* Paraboloid- und *Leitzschen* Spiegelkondensors können die Helldunkelfeld- oder Wechselkondensoren dieser Firmen verwandt werden, wenn Vergleich des Hellfeld- und Leuchtbildes erwünscht ist.

Erklärung der Abbildungen auf Tafel I.

Fig. 1. *Spirochaeta pallida*, Syphilisspirochäte im Ausstrich. Färbung: Osmium-Giemsa-Tanninmethode (eigenes Präparat).

Fig. 2. *Spirochaeta icterogenes* bzw. *icterohaemorrhagiae*, Gelbsuchtspirochäte, Erreger der *Weilschen* Krankheit im Leuchtbild. Die feinen Windungen und Endkörperchen sind gut erkennbar. Färbung: Osmium-Giemsa-Tanninmethode (eigenes Präparat).

Fig. 3. *Spirochaeta icteroides*, Gelbfieberspirochäte, im Schnitt der Niere eines mit Gelbfieber geimpften Meerschweinchens. Levaditfärbung (Präparat von *Noguchi*).

Fig. 4. Tuberkelbacillen im Ausstrich von Sputum. Carbofuchsin-Methylenblau-Färbung (eigenes Präparat).

Alle Abbildungen sind mit *Zeiß-Immersion X* und Komp. Okular 12, hergestellt. Die Leuchtkraft ist in der Wiedergabe nicht ganz zu erreichen.

Literatur: *Amann*, Zbl. f. Bakt. 1893, **XIII**, Nr. 24. — *Ed. Arning*, D. med. Woch. 1908, Nr. 7, S. 308; A. f. Derm. u. Syph. 1916, **CXXIII**, S. 233. — *M. Berek*, Berl. klin. Woch. 1921, Nr. 27, S. 740; Zt. f. wiss. Mikrosk. 1921 (noch im Druck). — *M. Ficker*, D. med. Woch. 1921, Nr. 11, S. 286. — *E. Hoffmann*, D. med. Woch. 1921, Nr. 3; Berl. klin. Woch. 1921, Nr. 4 u. 7; Derm. Zt. 1921, **XXXIII**, H. 1/2; Med. Klin. 1921, Nr. 29. — *Klein*, Mitt. a. d. Hamb. Staatskr.-Anst., **VIII**, H. 15. — *E. Keining*, M. med. Woch. 1921, Nr. 5 u. 15. — *F. W. Oelze*, M. med. Woch. 1919, Nr. 38 u. 1920, Nr. 32; Derm. Woch. 1920, **LXXI**, Nr. 42; Untersuchungsmethoden und Diagnose der Erreger der Geschlechtskrankheiten. München 1921. — *P. Schmidt*, A. f. Hyg., **LXIII**, H. 1; A. f. mikrosk. Anat. u. Entw., **LXXII**. — *W. J. Schmidt*, A. f. mikrosk. Anat., **XC**, Abt. 1. S. 201. — *H. Siedentopf*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1908 u. 1912. — *Silberstein*, D. med. Woch. 1921, Nr. 27, S. 775.

Die Anwendung der Photographie in der Mikroskopie (Farbenphotographie, Diapositive u. s. w.).

Von Prof. Dr. **W. Scheffer**, Berlin.

Mit 36 Abbildungen.

Die Mikrophotographie erzeugt zwangsläufig vergrößerte Bilder der mikroskopischen Objekte, die unseren Augen an Stelle des im Mikroskop bei der subjektiven Beobachtung wahrgenommenen Bildes dargeboten werden. Diese „Mikrophotogramme“ sind entweder für die Betrachtung mit einem Auge oder für die beidäugige „stereoskopische“ Betrachtung eingerichtet.

Sie ersetzen bis zu einem gewissen Grade das Bild des Objektes, das uns das Mikroskop bei subjektiver Beobachtung darbietet.

An diesem Bilde nehmen wir zunächst Helligkeits- und Farbschiede wahr; diese führen zu der Strukturwahrnehmung und zu einer geometrischen Auffassung des Objektes.

Ganz allgemein gesagt hat die Mikrophotographie die Aufgabe, Bilder zu erzeugen, die bei richtiger Betrachtung eine Schar Büschel von derselben Richtung, Farbe und *relativen* Helligkeit in unsere Augen senden, wie sie bei subjektiver Betrachtung das mikroskopische Bild durch die Austrittspupille des Mikroskopes in unser Auge sendet.

Die einfachsten Grundregeln der geometrischen Optik und der Lehre von der Beugung, soweit diese Bezug hat auf die mikroskopische Bilderzeugung, muß ich hier als bekannt — oder als an anderer Stelle genügend erläutert — voraussetzen.

Es gibt Einteilungsmöglichkeiten, die das vorliegende Gebiet besonders bequem, einfach und vollständig zu besprechen ermöglichen. Sie sind zuerst in der Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie (1919) veröffentlicht worden. Man kann die Gesamtheit aller überhaupt denkbaren Objekte auf einfache Weise nach ihrer Ausdehnung in den verschiedenen Dimensionen und nach ihrem Vorkommen in bestimmten Präparatformen auf Grund des Aggregatzustandes einteilen.

Augenscheinlich ist eine der einfachsten, allen überhaupt vorkommenden Objekten gemeinsame Eigenschaft die Ausdehnung im Raum. Diese, bezogen auf die drei Koordinaten, habe ich als Grundlage meiner Einteilung der Objektstrukturen genommen. Die amikroskopischen Gebilde habe ich natürlich der Vollständigkeit halber erwähnt. Der Begriff „amikroskopisch“ ist ebenso wie die beiden anderen, nämlich „submikroskopisch“ und „mikroskopisch“, relativ. Sie sind aber praktisch

recht bequem und brauchbar, und selbst wenn sich unsere Mikroskopie in ihrer Leistungsfähigkeit wesentlich änderten, dann würde ihre relative Bedeutung nur verschoben, aber nie grundsätzlich geändert werden. Die Unterteilungen a—f sind der mikroskopischen Praxis entnommen. Sie sind offensichtlich physikalisch selbstverständlich, umfassend, und auch sie entsprechen unseren systematischen Begriffen von der Materie durchaus, so daß diese Einteilung Aussicht hat, ebensolange zu bestehen, wie unsere physikalischen Grundvorstellungen.

Die Begriffe g gefärbt und u ungefärbt haben eine besondere Bedeutung für die praktische Arbeit, aber auch sie sind wohl begrenzt und wichtige physikalische Grundbegriffe.

Man wird im folgenden gelegentlich eine Bemerkung darüber vermissen, ob die Objekte mit einem Deckglas bedeckt sind oder nicht. Ich habe das absichtlich und nach reiflicher Überlegung aus diesem System weggelassen. Das Deckglas ändert den Strahlengang vom Objektpunkt zum Objektiv oder, anders gesagt, es entwirft ein virtuelles Bild des Objektes an einem andern als dem wahren Objektorte und dies Bild ist mit sog. Abbildungsfehlern behaftet. Das hat aber mit der Beschaffenheit des Objektes nichts zu tun und nach einiger Überlegung wird man einsehen, daß das Deckglas bei der vorliegenden Zusammenstellung nicht in Frage kommt.

I. In allen drei Dimensionen klein.

(a- und) submikroskopisch

S

a in Gasen

b in Flüssigkeiten

c in festen durchsichtigen Körpern

d in festen undurchsichtigen Körpern

e auf der Oberfläche von festen durchsichtigen Körpern

f auf der Oberfläche von festen undurchsichtigen Körpern

ea eb ec

fa fb fc

mikroskopisch

M

(gefärbt und
ungefärbt)

e

d

ea eb ec

fa fb fc

II. In zwei Dimensionen klein.

S

a

b

c

d

ea eb ec

fa fb fc

M

(gefärbt und
ungefärbt)

e

d

ea eb ec

fa fb fc

III. In einer Dimension klein.

M

(gefärbt und ungefärbt)

ea eb ec

fa fb fc

Folgende Beispiele werden den Sinn der Zusammenstellung deutlich machen. Ich habe mich bemüht, Beispiele zu finden, die jedem möglichst leicht zugänglich sind. ISa: Tabakrauch in Luft, ISb: kolloidale Silberlösung; man kann ein sehr zweckmäßiges Präparat unter dem Namen Collargol in der Apotheke ohne ärztliches Rezept bekommen. Dieses Präparat wird mit sehr viel destilliertem Wasser verdünnt. ISc: kolloidales Gold in starrer Lösung in Goldrubinglas. Kleine, für die Untersuchung passende Würfelchen mit zwei rechtwinklig zueinander stehenden feinpolierten Flächen liefern die optischen Werkstätten. ISd: nur aus formalen Gründen aufgeführt, ohne praktische Bedeutung. ISe: submikroskopische Pulver, die man nach sehr langem Reiben im Mörser bekommt. Zum Zerreiben eignen sich fast alle spröden, überhaupt zerreibbaren Stoffe. Man streut den Inhalt des Mörsers auf einen sauber geputzten, ganz trockenen Objektträger und klopft alles Überschüssige ab. Dann bleibt meist nur noch ein leichter Belag haften, der zum größten Teil aus sub- und amikroskopischen Teilchen besteht.

ISf: submikroskopische Strukturen, wie man sie auf gut polierten Metallschliffen findet, z. B. bei fast allen Stahlsorten, oder dasselbe, wie soeben bei ISe angegeben, nur auf einem Objektträger aus schwarzem Glas. Außer den „reinen“ Fällen a—f kommen noch einige begrifflich enger umgrenzte Kombinationsfälle vor, nämlich ea, eb, ec und fa, fb, fc. Sie stellen die in der Praxis häufigsten Fälle dar, in denen das Präparat auf einem Objektträger liegt. Die „reinen“ Fälle a und b kommen nur bei sub- oder amikroskopischen Teilchen vor, die dauernd in Gasen oder Flüssigkeiten sich schwebend erhalten. Meist haben wir einen Objektträger aus gewöhnlichem weißen und durchsichtigen Glas, e; es kann aber auch vorkommen, daß er undurchsichtig ist, f. Natürlich können die Präparate in Luft, a, einer Flüssigkeit, b, und einem festen Körper, c, etwa festgewordenem Kanadabalsam oder einem andern erstarrenden Körper, eingeschlossen sein. Praktisch unterscheiden sich die Fälle b und c meist wenig; man wird oft gar nicht wissen, ob der Balsam noch flüssig oder schon fest ist, aber gelegentlich wird die Frage doch Bedeutung bekommen. Die folgerichtige Durchführung des vorliegenden Einteilungsgedankens zwingt dazu, b und c zu unterscheiden.

Die Präparate können mit einem Deckglas bedeckt oder auch ohne dieses untersucht werden, z. B. werden Metallanschliffe nie mit einem Deckglas untersucht.

ISea, b und c bedeutet, daß submikroskopische Körperchen auf einem gewöhnlichen Objektträger in Luft, a, einer Flüssigkeit, b, oder in einem festen Körper, c, etwa erstarrtem Kanadabalsam, liegen. In den Fällen ISfa, b und c ist der Objektträger undurchsichtig.

Die sechs Fälle ea, eb, ec und fa, fb, fc kommen in jeder der folgenden Gruppen wieder vor. Ehe wir zur Gruppe M kommen, soll noch bemerkt werden, daß reine Fälle, in denen nur eine Größenordnung allein vorkommt, nicht sehr häufig sind. Meist haben wir Mischpräparate.

Es gilt die Regel, daß die Verhältnisse für die mikroskopische Untersuchung dann am günstigsten liegen, wenn möglichst geringe Größenunterschiede der Objektstrukturen im Präparat vorkommen. Sehr große Unterschiede in diesem Sinne können die Untersuchung erheblich erschweren, ja manchmal unmöglich machen.

IMc: kleine Einschlüsse in Glas oder in anderen durchsichtigen Körpern.

IMd: ohne Bedeutung.

IMea: ein feines Pulver, das auf einem Objektträger in Luft liegt.

IMeb: dasselbe, aber in einer Flüssigkeit, etwa Wasser oder Glycerin.

IMec: dasselbe in einem festen Körper.

Die Fälle werden meist mit einem Deckglas bedeckt vorkommen, gelegentlich haben wir aber auch unbedeckte Objekte, z. B. wenn man gefärbte Bakterien ohne Deckglas mit einer Immersion untersucht, IMgeb.

IMfa, b und c: dasselbe wie bei e, nur ist der Objektträger undurchsichtig.

In der Gruppe II befinden sich die in zwei Dimensionen kleinen Objekte, z. B. Haare, Fäden, Kratzer u. ä.

Haare, Spinnfasern und manche ähnliche Gebilde sind reine Vertreter der Klasse II, allerdings meist M. Zertrümmerte oder ganz fein zerschlissene Fasern, wie man sie an den ausgefaserten Enden findet, sind gelegentlich submikroskopisch dünn, S. (Im Schema finden sich einige Fälle, die Folgen der folgerichtig durchgeführten Idee des Aufbaues sind, zum Teil praktisch aber nicht in Frage kommen, z. B. d.) IISa, b und c: diese Formen kommen zurzeit praktisch nur in Betracht in der Form der Kombination IISea, b und c und weiter IISfa, b und c; d kommt nicht in Frage.

IISea: feinste Trümmer von Spinnfasern, wie man sie neben mikroskopischen zuweilen findet, wenn man alte, ganz weiche und mürbe Gespinste oder Gewebe über einem Objektträger abklopft. Auch wenn man den Objektträger einfach frei im Zimmer einige Zeit liegen läßt, findet man in dem abgesetzten Staub regelmäßig auch submikroskopisch kleine Fäserchen neben mikroskopischen. Man kann diese Fäserchen in Luft, a, in einer Flüssigkeit, b, und in erstarrtem Kanadabalsam, Kolloolith u. ä., letzteres in der Wärme, einbetten, c. Wenn man statt eines gewöhnlichen durchsichtigen einen undurchsichtigen Objektträger nimmt, bekommt man IISfa, b und c. In der Regel sind die Objekte in den Fällen IISe und f mit einem Deckglas bedeckt.

Die Fälle der Gruppe IIM entsprechen in ihrer Form ganz dem, was soeben über IIS gesagt wurde. IIMe geht praktisch über in IIMec.

Die Gruppe III umfaßt die Dünnschnitte, Dünnschliffe und Anschliffe. Hier fällt die Untergruppe S natürlich fort, und wir haben nur noch die in der Tabelle stehenden sechs Möglichkeiten. Auf g oder u achte ich vorerst nicht.

In der Gruppe III kommen nur die Kombinationen IIIMea, b und c und IIIMfa, b und c in Frage. IIIMea ist ein Schnitt oder Dünnschliff in Luft, b in einer Flüssigkeit und c in einem erstarrenden Harz, auf einem gewöhnlichen durchsichtigen Objektträger und meist mit einem Deckglas bedeckt.

IIIMfa ist z. B. ein polierter Anschliff eines Metallstückes, wie man ihn in der Metallographie untersucht, b stellt den Fall dar, wenn man ihn in einer Wasser- oder Ölimmersion untersucht, c wäre der praktisch nicht vorkommende Fall, daß auf den Anschliff mit einem erstarrenden Harz, etwa Kanadabalsam, ein Deckglas gekittet ist. Unter f kann auch der seltene Fall vorkommen, daß man einen Dünnschnitt, Dünnschliff oder ähnliches auf einem undurchsichtigen Objektträger untersucht. Ich habe gelegentlich hier recht bemerkenswerte Bilder bekommen.

Der Sinn der vorliegenden Einteilung wird nach dieser Erläuterung wohl jedermann klar sein; ihr Zweck liegt aber noch nicht offensichtlich zutage.

Dieser wird erst sinnfällig, wenn wir eine zweite, dieser entsprechende Einteilung der mikroskopischen Untersuchungsverfahren haben und sie zu ihr in Beziehung setzen. Das Nächstliegende und für die Praxis von heute Notwendigste ist eine

Einteilung und Zusammenstellung der Beleuchtungsmöglichkeiten.

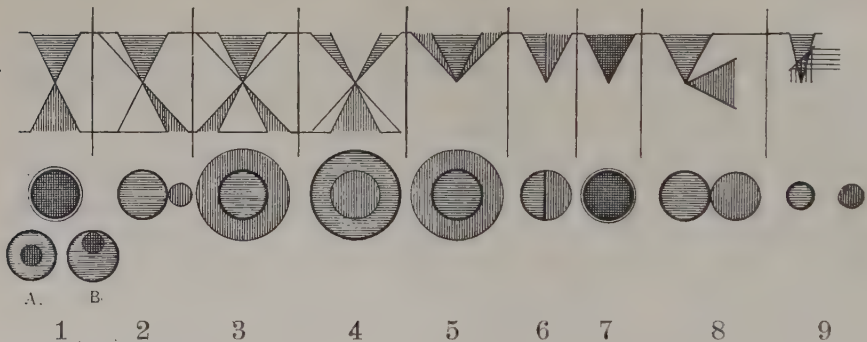
Das Zusammenwirken beider wird ihre Bedeutung erst recht klar machen. Der besseren Sinnfälligkeit halber stelle ich die verschiedenen Beleuchtungsmöglichkeiten durch schematische Zeichnungen dar, nicht durch wörtliche Sachbegriffe, wie in der ersten Tabelle der Objekte.

Im vorliegenden Beleuchtungsschema (Fig. 47) sind die beleuchtenden Büschel senkrecht, die abbildenden wagrecht schraffiert. In allen Zeichnungen ist die Schraffierung der Beleuchtung und der Abbildung gleich fein, nur bei 9 mußte, weil sonst die Abbildung ganz undeutlich geworden wäre, die Beleuchtung gröber schraffiert werden wie die Abbildung. Dies ist aber nur bei 9 oben geschehen, bei 9 unten sind beide gleich fein schraffiert. Die obere Reihe der Zeichnungen zeigt eine Reihe von Schnitten durch das abbildende und das beleuchtende Büschel. Die Achsen beider liegen in der Schnittebene. Die untere Reihe der Zeichnung zeigt das Verhalten der Pupillen zueinander. Einen Teil der Erscheinungen kann man in der hinteren Öffnung des Objektivs sehen, nachdem man das Okular aus dem Tubus genommen hat, nämlich die drei Fälle von 1 und außerdem noch 4. In den unteren Bildern sind die beleuchtenden Büschel schwach umkreist und die abbildenden stark.

1 ist die gewöhnliche Beleuchtung mit durchfallendem Licht. Das oberste der unteren Bilder zeigt den Fall, daß das beleuchtende und das abbildende Büschel dieselbe numerische Apertur haben, A und B zeigen Fälle der Ablendung des Kondensorbüschels, A bei gerader, B bei schiefer Beleuchtung. Die Fälle 2—9 sind alle Dunkelfeldbeleuch-

tungen. Man sieht, wieviel reichhaltiger die Möglichkeiten hier sind, als bei der Hellfeldbeleuchtung, deren einzige Möglichkeit mit ihren Variationen bei 1 schematisch dargestellt ist. Bei 2 wird mit einem schiefen Büschel beleuchtet, das bereits nicht mehr auf direktem Wege ins Objektiv gelangt. 3 stellt die bekannten Dunkelfeldkondensoren dar, die jetzt fast ausschließlich in der Praxis benutzt werden. 4 ist der sog. Wechselkondensor von *Zeiss*, bei dem das abbildende Objektiv zentral abgeblendet wurde. Das beleuchtende Büschel entspricht dem im Strahlengang des Objektivs ausgeschalteten. 5 ist der sog. *Lieberkühn*-Spiegel. 6 ist der bekannte Opak- oder Vertikalilluminator mit Prisma und 7 derselbe mit einer Planparallelplatte. 8 ist die älteste Form des Ultramikroskops, bei dem das beleuchtende und das abbildende Büschel senkrecht aufeinander stehen. Bei 9 wird das beleuchtende Büschel durch eine durchsichtige und zugleich spiegelnde Planparallelplatte auf

Fig. 47.



das Objekt gespiegelt. Natürlich wird nur ein gewisser Anteil der beleuchtenden Lichtmenge gespiegelt, der Rest geht unbenutzt durch die Planparallelplatte hindurch. Das vom Objekt kommende abbildende Licht geht teilweise durch die Planparallelplatte zum abbildenden Objektiv, der Rest wird zur Seite gespiegelt und geht wiederum verloren. Ich habe die Einrichtung 9 etwas eingehender beschrieben, weil ich nur sehr selten Mikroskopiker fand, die sie kennen. Ich habe die Beleuchtungseinrichtungen hier nicht eingehend beschrieben, weil ich den Aufsatz nicht beliebig ausdehnen kann. Es kommt hier vor allem auf das Systematische an.

Augenscheinlich kann man bei jeder Beleuchtung im soeben dargestellten Sinne außer den geometrischen Verhältnissen die Intensität (Quantität), die Farbe (Qualität) und den Polarisationszustand variieren. Zunächst und im allgemeinen wird man die Untersuchung mit weißem, nicht polarisiertem Licht beginnen. Da die Fig. 47, besser als Worte das allein vermögen, die verschiedenen geometrischen Möglichkeiten der Beleuchtung klarmacht, halte ich mich im folgenden an die Zahlenbezeichnung der Abbildung, so daß z. B. 7 bedeutet: Be-

leuchtung mit dem Opakilluminator und der durchsichtigen Planparallelplatte. Auf besonders feine Einzelheiten gehe ich hier nicht ein. Ich will hier nur das Grundsätzliche der Zusammenstellung und ihre Beziehungen zueinander dartun:

ISa: Die kleinen Gebilde können nur durch die Dunkelfeldbeleuchtungen sichtbar gemacht werden, die man mit dem Worte „Ultramikroskop“ bezeichnet. Man hat mit Erfolg 3, 4 und 8 angewandt. 4 hat 3 und 8 gegenüber nur Nachteile, so daß praktisch nur 3 und 8 in Frage kommen.

Für ISb gilt dasselbe. ISc: Man kann aus praktischen Gründen nur 8 mit Erfolg anwenden. ISd: Praktisch unmöglich. ISe: Beleuchtung 3; man könnte auch an die Anwendung von 2 und 4 denken; diese Beleuchtungsarten haben sich aber nur wenig bewährt. ISf: Beleuchtung 6 und 7. ISea, b und c: Man beleuchtet mit 3. Möglich, aber unbefriedigend sind 2 und 4.

ISfa: Beleuchtung nach 6 oder 7.

IMc: (Dieser Fall kann IMe mit den Unterabteilungen a, b, c sehr ähnlich sein, wenn z. B. ein feines Pulver auf einem Objektträger in festgewordenen Kanadabalsam eingebettet und mit einem Deckglas bedeckt liegt.) Je nach der Beschaffenheit kann man hier verschiedene Beleuchtungen anwenden. Wenn ein Dünnschliff vorliegt, beleuchtet man meist nach 1; gelegentlich kann man z. B., wenn der Unterschied des Brechungsindex zwischen Einschlußmedium und den eingeschlossenen Teilchen klein ist, auch 3 anwenden.

IMd: Praktisch unmöglich.

IMEa, IMeb und IMec verlangen ganz dieselbe Beleuchtung, nämlich meist 1, daneben auch nicht selten 3. IMfa, IMfb und IMfc: bei schwachen Vergrößerungen beleuchtet man nach 5 oder 9, bei stärkeren nach 6 oder 7.

IISa, b und c kommen in reiner Form allein kaum vor. Man richtet hier die Beleuchtung entsprechend dem ein, was bei dem korrespondierenden Gebilde der Klasse I gesagt wurde, aber man muß berücksichtigen, daß die Lage der Objektstruktur (Azimutlage der Objektstruktur) zur Richtung der Beleuchtung (Azimut der Beleuchtung) von entscheidender Bedeutung für das Zustandekommen der Abbildung ist.

Die Fälle IISea, b und c beleuchtet man mit 3. 2 und 4 sind möglich, kommen aber nur selten in Frage. IISfa, b und c werden mit 6 oder 7 beleuchtet. IIMEa, b und c: Man beleuchtet nach 1 oder 3. Selten kann auch 2 einmal als Beleuchtung in Frage kommen, besonders bei fadenförmigen Objektstrukturen.

IIMfa, b und c: Bei schwachen Vergrößerungen 5 und 9, bei starken 6 und 7. Für die Gruppe IIIM gilt dasselbe, was soeben für IIM gesagt wurde.

Im folgenden gebe ich noch eine Tabelle, in der die praktisch in Frage kommenden Objektstrukturen und daneben die in Frage kom-

menden Beleuchtungsverfahren zusammengestellt sind. Die theoretisch möglichen, praktisch aber unzweckmäßigen Beleuchtungsarten sind eingeklammert.

ISa:3 (4) 8
 b:3 (4) 8
 c:8
 d:— — —
 e:(2) 3 (4)
 f:6 7

ISea:(2) 3 (4)	ISfa:6 7	IMea:1 3	IMfa:5 9 6 7
b:(2) 3 (4)	b:6 7	b:1 3	b:5 9 6 7
c:(2) 3 (4)	c:6 7	e:1 3	c:5 9 6 7
IISea:(2) 3 (4)	IIIfa:6 7	IIMea:1 (2) 3	IIIfa:5 9 6 7
b:(2) 3 (4)	b:6 7	b:1 (2) 3	b:5 9 6 7
	c:6 7	e:1 (2) 3	c:5 9 6 7
IIIMea:1 3		IIIMfa:5 9 6 7	
b:1 3		b:5 9 6 7	
c:1 3		c:5 9 6 7	

Auf Grund der hier angedeuteten Systeme und ihres Zusammenhanges ist es leicht und von selbst gegeben, die verschiedenen Fälle und Möglichkeiten der Mikrophotographie im besonderen zu behandeln.

Bei der eingehenden Besprechung der verschiedenen Ausübungsarten der Mikrophotographie haben wir einen optischen und einen photochemischen Teil. Da die photochemischen Vorgänge in allen Fällen dieselben sind, besprechen wir sie im Zusammenhang am Ende dieses Aufsatzes, nachdem die physikalischen Vorgänge in den verschiedenen Fällen genügend erklärt sind.

Zunächst wollen wir das Gebiet noch teilen in Aufnahmen mit einfachen Objektiven, ein Aufnahmeverfahren, das etwa der Lupenbetrachtung als subjektivem Verfahren entspricht, also Aufnahmen bei schwächeren Vergrößerungen und — Aufnahmen mit dem zusammengesetzten Mikroskop — bei stärkeren Vergrößerungen. Die Gesamtheit aller mikrophotographischen Aufnahmen beruht auf denselben **photographischen** Verfahren und rein photographisch sind alle mikrophotographischen Aufnahmen einander in allem Wesentlichen **gleich**.

Bei allen photographischen Apparaten, sowohl den makrophotographischen, wie auch denjenigen für Mikrophotographie, haben wir folgende Hauptteile als wesentliche Stücke zu unterscheiden.

1. Als Basis des Ganzen einen Laufboden, mit Triebstange, Schienen, einer Säule oder einer sonstigen ähnlich wirkenden Einrichtung, die Vorder- und Hinterteil trägt und zueinander in der verlangten Stellung erhält. Bei gewöhnlichen Apparaten und auch bei

Apparaten für die Mikrophotographie mit schwachen photographischen Objektiven, also bei schwachen Vergrößerungen, kann diese Einrichtung auch zum Scharfeinstellen des Bildes dienen.

2. Das Vorderteil, das bei gewöhnlichen Kammeren das Objektiv trägt. Bei Aufnahmen mit dem zusammengesetzten Mikroskop ist an ihm die lichtdichte Verbindung mit dem Mikroskop befestigt.

3. Das Hinterteil trägt den bildauffangenden Schirm, d. h. Mattscheibe und lichtempfindliche Schicht mit der sie enthaltenden und schützenden Kassette.

4. Den Balgen, der die lichtdichte Verbindung zwischen Vorderteil und Hinterteil herstellt und den bildauffangenden Schirm gegen alles falsche Licht schützt.

5. Den sog. „Verschluß“, d. h. eine mechanische Vorrichtung, die die Belichtungszeit, die Zeit während der das Bild auf die lichtempfindliche Schicht projiziert wird und dort photochemisch wirkt, bestimmt. Kürzere Belichtungszeiten werden meist zwangsläufig vom Verschluß begrenzt, etwa von $\frac{1}{2}$ Sekunde ab. Die längeren Zeiten bestimmt man, indem man willkürlich den Verschluß öffnet, dann die Sekunden abzählt und im gegebenen Augenblick wieder schließt.

Wir haben also Vorderteil, Hinterteil, ihre mechanische Verbindung, ihre lichtdichte Verbindung und den Verschluß als wichtigste Teile der — besonders mikrophotographischen — Kammer.

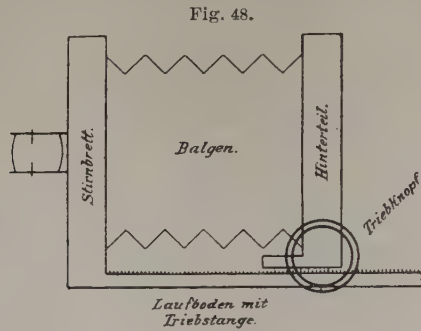
Natürlich können die Leistungen der verschiedenen Hauptteile auf verschiedene Weise verwirklicht werden, so daß die hier schematisch angedeuteten Kameraformen nur sozusagen „funktionelle“ Schemata sind. Aber gerade solche Darstellungen vertiefen das Verständnis und regen zur allgemeinen Betrachtung des Gegenstandes an, die dann in der Praxis der Sonderfälle die nötigen Überlegungen erleichtert und vertieft.

Statt des Triebes am Laufboden hat man z. B. bei schwachen Vergrößerungen, die mit kurzbrennweitigen photographischen Objektiven gemacht werden, einen Stutzen am Vorderteil, in dem das Objektiv irgendwie verschiebbar ist, etwa durch Schneckenrieb, oder Zahn- und Triebbewegung. Bei starken Vergrößerungen, also Aufnahmen mit dem zusammengesetzten Mikroskop hat man überhaupt keine Scharfeinstellungsvorrichtung an der Kammer nötig, hier bedient man sich der Mikrometerbewegung des Mikroskopstatives.

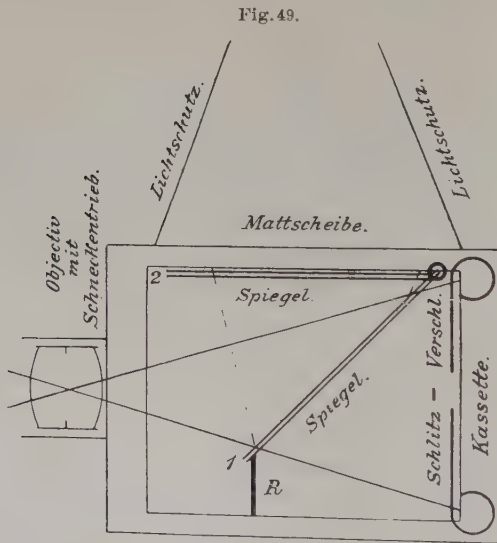
Als besonders wichtigen und für die Mikrophotographie noch lange nicht genug beachteten Typ haben wir die sog. Spiegel- oder Reflexkammer.

Fig. 48 zeigt schematisch eine gewöhnliche Kammer in der allgemeinsten Form, Fig. 49 eine Spiegel- oder Reflexkammer. (Das Wort „Spiegelreflexkammer“ sollte aus der technischen Sprache der Photographie verschwinden.)

Das Wesentliche dieser Einrichtung besteht darin, daß die Mattscheibe zum Einstellen und die Kassette mit der lichtempfindlichen Platte für die Aufnahme an verschiedenen Orten der Kammer liegen.



Die Kassette liegt ebenso, wie bei der gewöhnlichen Kammer, im Hinterteil, gegenüber dem Objektiv. Die obere Seite der Kammer trägt die Mattscheibe zum Einstellen, und im Innern des Kastens ist ein Spiegel



angebracht, der, heruntergeklappt (1), die vom Objektiv kommenden Strahlenbüschel knickt und zur Mattscheibe spiegelt.

Diese wird durch die mit „Lichtschutz“ bezeichnete Einrichtung gegen falsches Licht geschützt und dient zum Scharfeinstellen des Bildes. Für die Aufnahme wird zunächst der Spiegel in die Stellung 1 gebracht, der Schlitzverschluß gespannt und die Kassette aufgezogen. Dann stellt man das bewegte Objekt scharf ein und bringt den Spiegel

in Stellung 2. Sobald der Spiegel oben angelangt ist, löst er den Schlitzverschluß aus, und die Belichtung erfolgt.

In Stellung 1 schützt der Spiegel zugleich mit dem Rahmen *R* und dem Schlitzverschluß die in der Kassette freiliegende lichtempfindliche Schicht gegen das von dem Objektiv kommende Licht.

In Stellung 2 verschließt er die Öffnung des Kamerakastens, so daß durch die Mattscheibe kein falsches Licht in das Innere der Kammer dringen kann. Es ist leicht einzusehen, daß für diese Einrichtung ein in der Nähe der lichtempfindlichen Schicht liegender Verschluß, also ein Schlitzverschluß notwendig ist.

Natürlich kann man den in der Figur angedeuteten Schneckentrieb, der für Aufnahmen mit kurzbrennweitigen Objektiven sehr angenehm ist, durch einen Laufboden mit Balgen ersetzen. Die Erfindung der Spiegelkammer verdanken wir *R. Neuhauf*.

Man hat die mikroskopische Kammer sowohl liegend, wie auch aufrechtstehend angeordnet. Im ersteren Falle muß natürlich das Mikroskop auch umgelegt werden, so daß seine Achse mit der Kameraachse zusammenfällt. Die aufrechte Anordnung hat gewisse Vorteile. Z. B. bei der Aufnahme von in Flüssigkeiten liegenden Objekten, sowohl bei starken, wie bei schwachen Vergrößerungen, ist es viel angenehmer, mit aufrechtem Mikroskop und wagrechtstehendem Objektstisch zu arbeiten. Man kann sich natürlich mit Prismen helfen, aber das hat verschiedene Unannehmlichkeiten. Die horizontale Einrichtung mit meist sehr langem, liegendem Balgen hat nur den einen Vorzug, daß bei jeder beliebigen Balgenlänge die Höhenlage der Mattscheibe dieselbe ist, und die einzige wesentliche Unbequemlichkeit der aufrechtstehenden mikrophotographischen Kammer ist die, daß bei der Änderung des Auszuges die Höhenlage des bildauffangenden Schirmes sich ändert. Bei längeren Auszügen kann das recht unbequem werden, aber nach meinen Erfahrungen, die eine rege Tätigkeit auf dem Gebiete der Mikroskopie und Mikrophotographie von mehr als 25 Jahren umfassen, kann man alle überhaupt vorkommenden Aufgaben der Mikrophotographie auf das beste mit der aufrechtstehenden Kammer lösen, und in vielen Fällen ist diese der liegenden Einrichtung erheblich überlegen. Das Fehlen des sehr langen Auszuges hat mich nie gestört. Man kann ebensogut mit weniger langen Balgenauszügen die stärksten in Frage kommenden Vergrößerungen erreichen, und eine Balgenlänge, die von 25 bis 50 *cm* geht, ist sicherlich für alle vorkommenden Fälle vollständig genügend. Diese Dimensionen kann man aber mit der aufrechten Einrichtung ohne weiteres erreichen, ohne jede Unbequemlichkeit.

Als Aufnahme- und Kameraformat scheint mir 9:12 am geeignetsten zu sein. Man hat im allgemeinen Bildkreise von etwa 5 bis 8 *cm* Durchmesser, die auf eine solche Platte gut passen. Aus Sparsamkeitsrücksichten habe ich mir Kassetten und einen Zwischenrahmen vom

Format 6:9 machen lassen. Man erspart gelegentlich hiermit ziemlich beträchtliche Werte.

Auch für die Projektion ist dieses Format das angenehmste, und es ist selbstverständlich, daß man bestrebt ist, in der Negativ-, Diapositiv- und Bildersammlung **nur ein** bestimmtes **Format** zu haben.

Auch für Übersichtsbilder, die natürlich gelegentlich ein wesentlich größeres Format als 9:12 haben müssen, ist dieses Format als Aufnahmeformat am geeignetsten. Man macht einfach Vergrößerungen der 9:12 Originalaufnahmen. Mit der hier in Frage kommenden Vergrößerung kann man, ohne daß das Bild irgend merklich an Schärfe verliert, ziemlich weit gehen; gute Negative geben bei einer etwa siebenfachen Linearvergrößerung noch ganz vollendet scharfe Vergrößerungen. Diese Bildgröße geht aber weit über das selbst in äußersten Fällen Verlangte hinaus.

Die Spiegelkammer hat den großen Vorteil, daß man das Objekt bis zu dem letzten Augenblick vor der Aufnahme auf dem bildauffangenden Schirm beobachten kann. Bewegliche Objekte kann man nur so mit Sicherheit scharf einstellen und in die Mitte des Gesichtsfeldes und des Bildes bringen. Auch bei sehr starken Vergrößerungen, bei denen sich die Einstellung bekanntlich oft in sehr ärgerlicher Weise ändert, gibt die Spiegelkammer zunächst wenigstens die Sicherheit, daß das Bild im Augenblick des Beginnes der Belichtung scharf ist. Um die Brauchbarkeit dieser Einrichtung noch weiter und strenger zu prüfen, habe ich Aufnahmen der schwierigsten Objekte, die für die geringste Änderung der Einstellung besonders empfindlich sind, nämlich von Diatomeen, bei sehr hohen Aperturen so ausgeführt, daß die Aufnahme durch Herunterlassen des Spiegels und Nachprüfen, gegebenenfalls Nachstellen der Einstellung mehrmals unterbrochen wurde, in manchen Fällen, in denen sehr lange Belichtungen nötig waren, 10—20mal. Alle auf diese Weise hergestellten Aufnahmen sind vollendet scharf geworden, so daß ich dieses Verfahren in besonders schwierigen Fällen als das einzige empfehlen kann, das mit Sicherheit auch bei den längsten Belichtungen und den stärksten Vergrößerungen scharfe Bilder erzwingt.

Jeder, der sich mit Aufnahmen etwa der Körnung von *Amphipleura pellucida* oder ähnlichen schwierig zu photographierenden Objekten beschäftigt hat, wird das zu würdigen wissen.

Schon die Aufnahmen mit kurz Brennweiten photographischen Objektiven, z. B. den Mikrosummaran, Mikroplanaren, Mikroluminaren, sind nicht ganz einfach und bieten eine Fülle von verschiedenen Möglichkeiten und Versuchsanordnungen dar.

Wenn wir uns um irgend einen Objektpunkt eine Kugel gebildet denken, dann kann — wir wollen diesen Punkt zunächst theoretisch als isoliert im Raume denken — dieser Punkt sowohl von allen Richtungen

des Raumes, Kugelradien, aus beleuchtet wie auch mit Strahlen abgebildet werden, die von ihm aus in diesen Richtungen verlaufen.

Praktisch teilen wir diesen Kugelraum nach Fig. 50 in zwei Gebiete, das der Hellfeldbeleuchtung, bei dem die beiden koaxialen Kegelräume AOB und COD , jener den Raum der abbildenden, dieser den Raum der beleuchtenden Büschel für den Objektpunkt O auf der Achse bedeuten, und das der Dunkelfeldbeleuchtung: AOB , AOC und BOD sind die drei Gebiete, in denen eine solche möglich ist.

Bei der Hellfeldbeleuchtung geht also das beleuchtende Büschel direkt in das Objektiv, und das Objekt verkündet sein Dasein optisch dadurch, daß es einen Teil des darauf einfallenden Lichtes durch Ablenkung oder Absorption verhindert, in das Objektiv zu gelangen. In

Fig. 50.

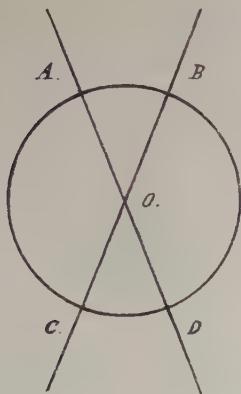
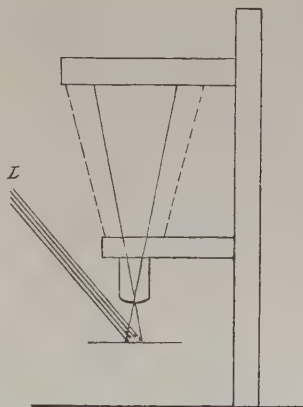


Fig. 51.



diesem Falle setzt also das Objekt relative oder absolute Dunkelheit, es erscheint **dunkel** auf hellem Felde.

Bei der Dunkelfeldbeleuchtung kann nichts von den beleuchtenden Büscheln direkt in das abbildende Objektiv gelangen, und das Objekt leitet einen Teil des beleuchtenden Lichtes in das Objektiv — es wird durch das auffallende Licht leuchtend und ein Teil der Büschel, die der so leuchtend gemachte Objektpunkt in den Raum hinaussendet, gelangt in das Objektiv — das Objekt erscheint **hell** auf dunklem Grunde. Es sei hier nebenbei bemerkt, daß wir im gewöhnlichen Leben und alltäglichen Sehen fast ausnahmslos „im Dunkelfeld“ sehen, reines Hellfeld kommt fast nie vor, gelegentlich ein Mischfall aus beiden Beleuchtungen. Die Fälle der Dunkelfeldbeleuchtungen des Gebietes der schwachen Vergrößerungen sind außerordentlich mannigfaltig und sehr wichtig. Hier gibt es nicht wie bei den stärkeren Vergrößerungen mit dem zusammengesetzten Mikroskop Schemata, nach denen man sich wenigstens einigermaßen richten kann; hier muß die Beleuch-

tung in jedem Falle dem Objekt besonders angepaßt werden, und der wirklich Erfahrene weiß, daß gerade diese Aufnahmen zeigen, ob der Mikrophotograph Erfahrung, Geschick und Verständnis für die schwierigeren Aufgaben hat; besonders die Beleuchtung ist hier oft nur mit Mühe zufriedenstellend einzurichten.

Fig. 51 zeigt schematisch den Aufbau und den Strahlengang für das ganze Bildfeld. Die beleuchtenden Büschel *L* kommen von einer beliebigen Lichtquelle. Für diese Fälle ist die aufrechte Einrichtung fast immer von Vorteil; man denke nur an die vielen körperlichen Objekte, die bequem auf einer wagrechten Unterlage liegen bleiben, aber nur mit großer Mühe an einer senkrechten Platte festgehalten werden könnten, wie sie die liegende Kammer verlangt. Auch die Beleuchtung ist meist viel leichter und unschwieriger bei der aufrechten Einrichtung herzustellen.

Wir nehmen, um allgemeine Betrachtungen über die Objektbeleuchtung anzustellen, zunächst als Objekt eine Halbkugel an, die auf einer

Fig. 52.

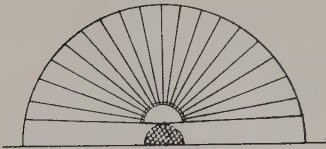
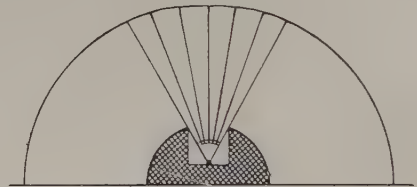


Fig. 53.

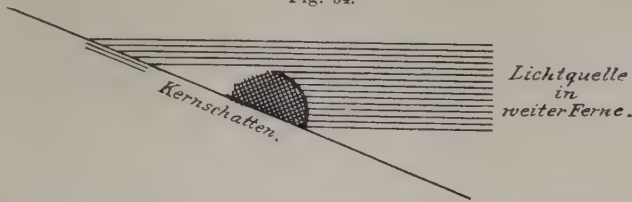


ebenen Unterlage steht. In Fig. 52 ist die sog. diffuse Beleuchtung, von der wir ausgehen wollen, dargestellt. In der Natur stellt ein gleichmäßig mit weißen Wolken bedeckter Himmel diesen Fall dar; Fig. 52 zeigt schematisch diese Beleuchtung. Die Halbkugel ist durch Schraffierung kenntlich gemacht, der in Frage kommende Punkt auf ihrer Oberfläche durch den kleinen schwarzen Punkt. Der Öffnungswinkel der Büschel, die denselben beleuchten, ist durch den doppelten Kreisbogen angedeutet. Bei dieser Beleuchtung wird jeder Objektpunkt mit dem größten überhaupt möglichen Öffnungswinkel beleuchtet; mit anderen Worten, er sieht das größte überhaupt mögliche Stück der Lichtquelle, und jeder an der Oberfläche liegende Objektpunkt muß ein Stück der Lichtquelle sehen. Man hat also bei dieser Beleuchtung ein Minimum von Schatten, und Kernschatten treten überhaupt nicht auf.

Fig. 53 zeigt, wie auch bei dieser Beleuchtung die räumliche Struktur des Objektes durch Helligkeitsunterschiede sichtbar gemacht wird. Die Halbkugel hat hier eine Vertiefung, und man sieht aus der Figur ohne weiteres, daß ein in der Tiefe liegender Punkt der Objektoberfläche mit einem kleineren Öffnungswinkel beleuchtet wird, also verhältnismäßig dunkel erscheinen muß. Den Gegensatz zu dieser diffusen Beleuchtung zeigt Fig. 54. Dieser Fall tritt ein, wenn mit einer Lichtquelle von geringer

Ausdehnung einseitig beleuchtet wird, allgemein gesagt, wenn man mit einem Bündel oder einer Schar von nahezu gleichgerichteten Bündeln von sehr geringer Apertur beleuchtet. Das durch den stark ausgezogenen Kreisbogen angedeutete Stück der Objektoberfläche wird voll beleuchtet, das punktiert angedeutete überhaupt nicht. Beide grenzen ohne Übergang schroff und unvermittelt aneinander. Die beleuchtenden Bündel haben hier einen verschwindend kleinen Öffnungswinkel, und

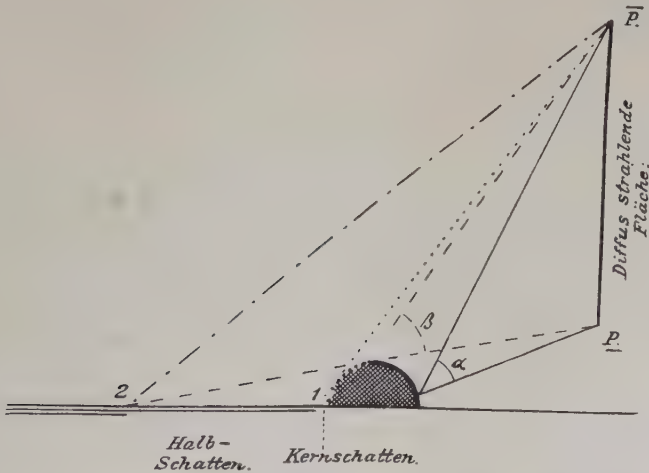
Fig. 54.



man bekommt nur sehr dunkle Kernschatten, die mit schroffem Übergang an das von der Lichtquelle direkt beleuchtete Gebiet anschließen.

Fig. 55 zeigt die Wirkung einer diffus strahlenden Fläche von gewisser Ausdehnung. Ein gewisser Teil der Objektoberfläche wird von der

Fig. 55.



ganzen Lichtquelle bestrahlt; er ist durch den stark ausgezogenen Kreisbogen angedeutet. Alle in diesem Gebiet liegenden Objektpunkte sehen die ganze Lichtquelle. Der äußerste noch voll beleuchtete Objektpunkt sieht sie unter dem Winkel β . Ein weiteres Stück wird von immer geringer werdenden Teilen der Lichtquelle beleuchtet. Dies ist punktiert, und das durch den dünnen Kreisbogen angedeutete Stück der Objektoberfläche wird überhaupt nicht beleuchtet; beim Schatten unterscheiden wir das vollkommen dunkle Gebiet des Kernschattens das bei 1 in das allmählich

heller werdende Gebiet des Halbschattens ohne scharfe Grenze übergeht, und dieses verläuft allmählich bei 2 in das von der ganzen Lichtquelle bestrahlte Gebiet der ebenen Unterlage. Es ist die Kunst des Mikrophotographen, das Objekt möglichst günstig zu beleuchten. Daß man bei der Beleuchtung auch an die Gradation, d. h. die Art der relativen Helligkeitswiedergabe der benutzten Trockenplatten denken muß, ist ebenso selbstverständlich wie selten beachtet.

Für die Beleuchtung mit auffallendem Licht gilt ganz allgemein, daß jedem Strukturunterschied der Oberfläche des Objektes ein Helligkeitsunterschied im Bilde entsprechen soll, und weiter, daß kein Teil der Objektoberfläche so wenig beleuchtet sein darf, daß er im Bilde vollkommen dunkel und strukturlos erscheint. Ebenso wenig darf natürlich ein Stück der Objektoberfläche so übermäßig hell beleuchtet sein, daß im Bild wiederum die Einzelheiten verschwinden und die Objektoberfläche an dieser Stelle weiß und strukturlos erscheint. Die richtige Anwendung der in dieser Abhandlung besprochenen Beleuchtungsmöglichkeiten wird immer zum Ziel führen, zumal, da hier zum ersten Male der Versuch einer möglichst vollständigen und systematischen Darstellung gemacht ist.

Die verschiedene Oberflächenbeschaffenheit der Objekte macht für den vorliegenden Zweck eine weitgehende Anpassung und Veränderungsmöglichkeit der Beleuchtungsvorrichtungen nötig. Bei der Verschiedenheit und Vielseitigkeit der mikroskopischen Aufgaben, die hier vorkommen, macht sich immer mehr das Bedürfnis nach möglichster Vereinfachung und Vereinheitlichung geltend. Ein Teil der hier beschriebenen Einrichtungen ist auch für die Beleuchtung mit dem Vertikalilluminator ein bequemes Hilfsmittel, und alle Beleuchtungen, die überhaupt vorkommen, können bei unveränderter Aufstellung des Mikroskops sowie der kleinen Bogenlampe, der optischen Bank und der Kamera auf einfache Weise rasch hergestellt werden. Wenn auch in den meisten mikroskopischen Laboratorien ein besonders rascher Übergang, z. B. von der Beleuchtung mit durchfallendem Licht zu der Beleuchtung mit dem Vertikalilluminator kaum vorkommt, so ist anderseits für einen sehr vielseitigen Betrieb, der mit möglichster Zeitersparnis arbeiten muß, eine solche Möglichkeit des raschen und bequemen Überganges von großer Annehmlichkeit.

Bei der hier in Frage kommenden Beleuchtung habe ich den Grundsatz befolgt, der eigentlichen Beleuchtungseinrichtung durch die aplanatische Sammellinse paralleles oder schwach konvergentes Licht zuzuführen und die für die Beleuchtung notwendigen Änderungen durch die *eigentliche Beleuchtungseinrichtung* zu bewirken. Diese ändert die Beschaffenheit des ursprünglichen, vom Kollimator oder Kollektor kommenden, parallelen Büschels. Wir haben Einrichtungen zu unterscheiden, die wirken durch:

- A. Spiegelung,
- B. Brechung und
- C. diffuse Streuung des Lichtes.

Die Veränderungen können sich beziehen auf:

- a) das ganze Büschel oder einen Teil desselben,
- b) mehrere gesonderte Teile desselben Büschels.

Fig. 56 zeigt die einfachste und wohl am häufigsten für kleine räumliche Gegenstände benutzte Einrichtung des Falles Aa; das aus den parallelen Büscheln 1—5 zusammengesetzte Gesamtbüschel bestrahlt das durch den Doppelkreis angedeutete kleine Objekt. Die direkte Be-

Fig. 56.

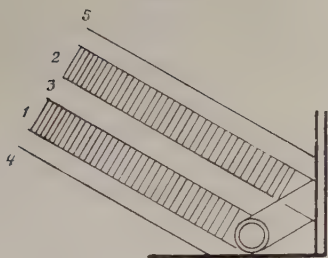
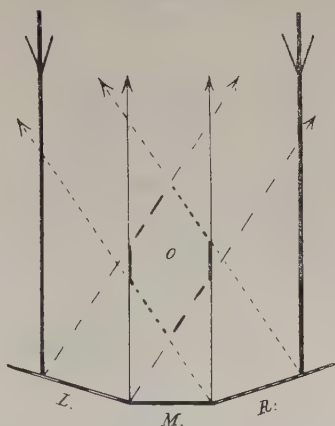


Fig. 57.



leuchtung erfolgt durch den schraffierten Teil 1. Hinter dem Objekt ist ein Spiegel aufgestellt, angedeutet durch die beiden starken Linien. Er knickt den auf ihn fallenden Teil des Büschels und bewirkt eine Beleuchtung der von der Lichtquelle abgewandten Seite des Objekts. Diese erfolgt durch den Inhalt des ebenfalls schraffierten Büschels 2. Die Teile 4 und 5 sowie der Teil 3 gehen für die Beleuchtung verloren. Es geht ohneweiters aus der Fig. 56 hervor, daß der Verlust an 3 mit der Entfernung des Spiegels vom Objekt wächst, und daß infolgedessen der Durchmesser des gesamten Büschels desto größer sein muß, je weiter der Spiegel vom Objekt entfernt wird.

Man wird also denselben so nahe wie möglich an den Aufnahmegegenstand heranbringen. Durch Neigen des Spiegels kann man die Richtung des von hinten beleuchtenden Lichtbüschels beliebig ändern.

Fig. 57 zeigt eine in den meisten Fällen ausreichende, recht bequeme Einrichtung des Falles Ab. Die drei Spiegel L, M, R sind fest miteinander verbunden. Sie beleuchten das Objekt von hinten und von beiden Seiten, und außerdem wird es direkt von vorne beleuchtet. Eine derartige Einrichtung kann man sich auf einfachste Weise selbst her-

stellen. Fig. 58 zeigt, wie man mit Hilfe von 5 Spiegeln das Objekt in vier zueinander senkrechten Richtungen beleuchten kann. Die beiden rechten Spiegel sind in der Figur als selbstverständlich weggelassen. Das Objekt in O ist durch den doppelten Kreis angedeutet. Für eine derartige Beleuchtung muß das Gesamtbüschel einen gewissen Durchmesser haben.

Aus Fig. 59 geht hervor, daß gleichgebaute Sammellinsen sich nur durch die Brennweiten als Kollimatoren unterscheiden, vorausgesetzt, daß das Bündel mit dem geringsten Durchmesser das hellste ist. Ein Punkt der Lichtquelle L bestrahlt die Pupille der Sammellinse (Ein- und Austrittspupille sind der Einfachheit halber als zusammenfallend bezeichnet), und diese strahlt paralleles Licht in ihren Bildraum. Die

Fig. 58.

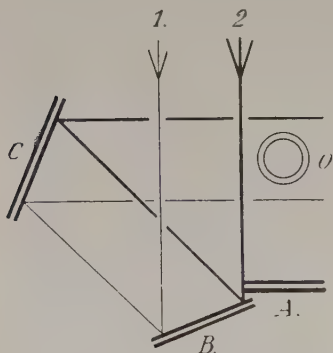
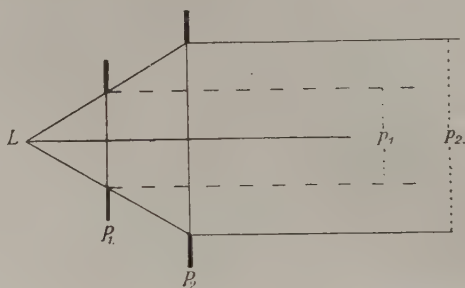


Fig. 59.



Pupille P_1 sendet ein Bündel vom Durchmesser p_1 und P_2 ein solches vom Durchmesser p_2 aus. Die Flächen der Querschnitte der beiden Bündel verhalten sich wie die Quadrate ihrer Durchmesser.

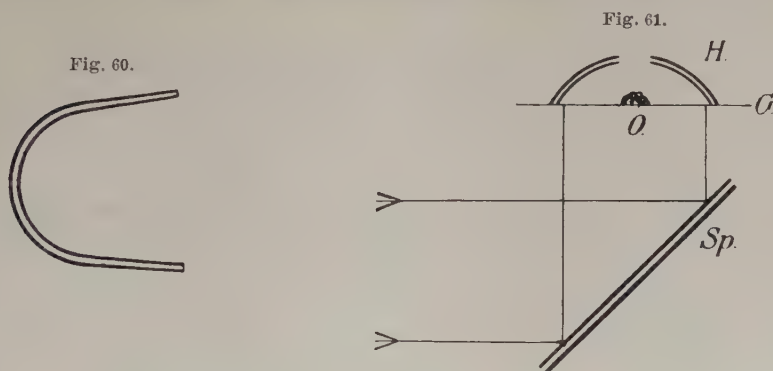
Es wird also die im Objektraum in einem gewissen Kegelraum enthaltene Lichtmenge im Bildraum in verschiedenen weiten Lichtrohren je nach dem Ausführungsmaßstab der Sammellinse verlaufen. Soweit meine Erfahrungen gehen, genügt für fast alle Zwecke die Beleuchtung nach A, wobei nur Planspiegel angewandt und die Bündel nur geknickt werden.

Im Falle B wird im allgemeinen die Austrittspupille eines Kollektors auf dem Objekt abgebildet. In diesem Falle wird natürlich dem Beleuchtungsapparat kein paralleles, sondern schwach konvergentes Licht zugeführt, denn die Lichtquelle muß auf der Beleuchtungslinse abgebildet werden. C ist eine Verbindung der Fälle A und B; hier sind natürlich viele Variationsmöglichkeiten vorhanden. Überhaupt ist bei der vorliegenden Beleuchtungsart der Geschicklichkeit des Mikroskopikers viel überlassen.

Fig. 60 zeigt, von oben gesehen, eine im Gebrauch besonders einfache Einrichtung nach C. Sie ist ein nach der Figur gebogenes Stück

Messingband, das auf der Innenseite mit einer diffus streuenden weißen Schicht ausgekleidet ist. Auch diese Einrichtung gehört zu den am meisten gebrauchten und bequemsten Hilfsmitteln zu unserem Zweck.

Eine weitere, ebenfalls sehr bequeme Einrichtung zeigt Fig. 61. Das parallele Lichtbündel fällt auf den Mikroskopspiegel Sp und geht durch die Glasplatte G , auf der das Objekt O liegt. Über dasselbe ist H gestülpt, ein Reflektor, der innen, ebenso wie die Beleuchtungseinrichtung in Fig. 60, mit einer weißen diffus streuenden Auskleidung versehen ist. Wenn H spiegelt, muß in der Öffnung von H ein Bild der Lichtquelle entworfen werden, das diese Öffnung ganz erfüllt. Dann bildet H die Öffnung des Kollektors auf dem Objekt ab. Diese Einrichtung ist bereits von *Des Cartes* (*Cartesius*) beschrieben und abgebildet.



Das vom Kollimator kommende Bündel ist auf diesem Wege zur eigentlichen Beleuchtungseinrichtung bequem zugänglich. Man kann es sowohl im ganzen wie auch teilweise schwächen. Da es meist paralleles Licht enthält, kann man durch geeignete Anordnung von Matt- oder Farbscheiben, die nur von gewissen Teilen des Bündels durchdrungen werden, besondere Licht- und Schattenwirkungen hervorbringen, die auf andere Weise nur recht schwer zu bekommen sind. Meist sind die mikrophotographischen Einrichtungen nur für durchfallendes Licht eingerichtet, und für den vorliegenden Zweck müssen oft recht unbequeme Gelegenheitsanordnungen hergestellt werden. Ich möchte hier auf ein sehr einfaches und altbekanntes Hilfsmittel hinweisen. Auch für unsere Zwecke liegen die Objekte, ähnlich wie für durchfallendes Licht auf dem Objektstisch des Mikroskops. Man kann diesen bei den vollendeten Stativen um einige Zentimeter heben und senken. Das genügt aber nicht. Mit der in Fig. 62 angedeuteten Spiegeleinrichtung, die mit einem Reiter auf die optische Bank gesetzt wird, knickt man den Strahlengang des vom Kollimator kommenden parallelen Bündels zweimal. Durch Neigung des Spiegels 2 und gegebenenfalls Höher- oder Tieferstellen desselben, kann man das Bündel bequem in geeigneter Weise zum

Objekt neigen. Wir nehmen hier ein aufrechtstehendes Mikroskop an. LU ist dann der direkte Weg des Büschels zum Mikroskopspiegel, LO der Weg für die hier in Frage kommende Beleuchtung, und außerdem kann man diese Spiegeleinrichtung für den Gebrauch des Vertikal-illuminators benutzen. Man kann also Mikroskop und Bogenlampe immer unberührt stehen lassen und braucht nur die Spiegeleinrichtung (Fig. 62) auf die optische Bank zu setzen. Hierbei ist besonders bequem, daß die Tischhöhe und die Stellung des Mikroskops immer dieselbe bleiben, so daß man jede beliebige Arbeit bequem im Sitzen mit der einmal als angenehm angenommenen Körperhaltung ausführen kann.

Fig. 62.

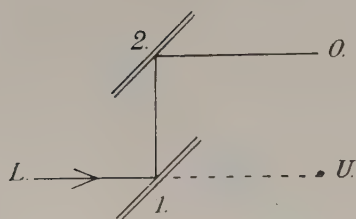
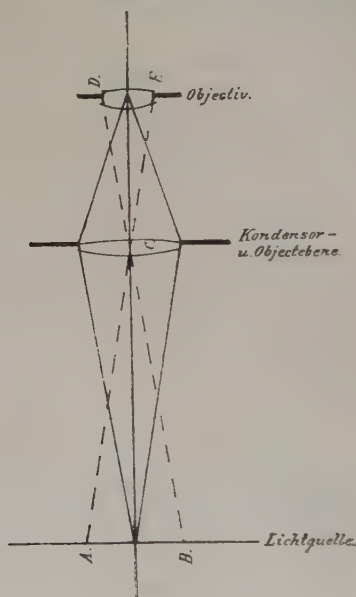


Fig. 63.



Bei der Mikrophotographie und der Mikroprojektion mit kleinen photographischen Objektiven bei geringer Vergrößerung bis etwa 50fach, ist der Strahlengang im Grunde derselbe, wie bei der Makroprojektion gewöhnlicher photographischer Diapositive, der photographischen Vergrößerung und ähnlichen Verfahren. Die Lichtquelle wird von einem Kondensor in der Eintrittspupille des abbildenden Objectives abgebildet, und dies bildet seinerseits die Austrittspupille des Kondensors und das auf ihr liegende Diapositiv oder Präparat ab. Den Strahlengang hierbei zeigt schematisch Fig. 63.

Kondensor und Objektiv sind durch Blendenöffnungen angedeutet, die zugleich für die — zusammenfallend gedachten — Ein- und Austrittspupille stehen. Die Lichtquelle sei eine beliebig große gleichmäßig strahlende Milchglasseibe, vor der eine Irisblende steht. Das Objekt,

in der Figur ebenso wie die Irisblende nicht angedeutet, liegt auf dem Kondensor.

Der ausgezogene Strahlengang zeigt die Abbildung eines Punktes der Lichtquelle im Objektiv, die beiden anderen, der gestrichelte und der punktierte, deuten in zwei Fällen die Größe des Lichtwellenweges im Objektiv an. Sie zeigen zugleich die Öffnung des den Objektpunkt beleuchtenden Büschels.

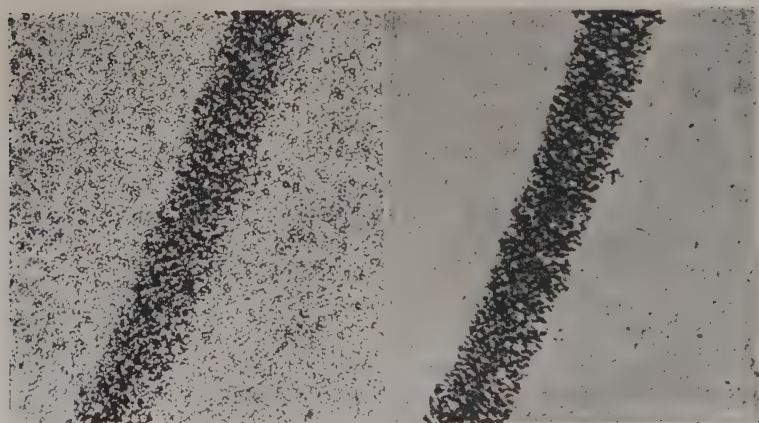
Wenn man einen Objektpunkt in durchfallendem Licht projizieren will und die Iris vor der Lichtquelle immer weiter öffnet, dann kommt man zu einer Irisöffnung, bei der eben gerade die ganze Öffnung des Objektivs mit direktem Licht erfüllt ist. Wenn man die Iris weiter öffnet, geht der äußere Teil des Kegels am Objektiv vorbei. Er erzeugt Dunkelfeldbeleuchtung, diese wirkt besonders bei ungefärbten Objekten sehr störend, da sie ein in seinen Helligkeitsabstufungen ungefähr entgegengesetztes Bild gibt, wie die Beleuchtung mit durchfallendem Licht. Wenn man ungefärbte Objekte von sehr zarter Struktur hat, ist es oft von der größten Wichtigkeit für die Güte der Abbildung, daß man sehr sorgfältig durch Versuche feststellt, welche Öffnung des beleuchtenden Kegels das beste Bild gibt. Man kommt dann oft dazu, nur einen Teil des Objektivs mit direktem Licht, also dem Büschel der primären Maxima zu erfüllen und den Maximis höherer Ordnung, die von dem vornehmlich durch Beugung sichtbar werdenden ungefärbten Objekt ausgehen, eine bessere Gelegenheit zur merklichen Wirkung zu geben. Das geschieht, wenn man nur einen — meist den mittleren — Teil der Objektivöffnung mit direktem Licht erfüllt. In der Praxis kann man auf folgende Weise verfahren. In einem Abstand von etwa 20—30 cm vom Kondensor stellt man eine vollkommen streuende Matt- oder Milchglas-scheibe auf. Hinter dieser (in der Fortpflanzungsrichtung des Lichtes gemeint) steht eine große Irisblende. An Stelle des Kondensors nach *Abbe* sitzt im Beleuchtungsapparat ein einfacher Kondensor von langer Brennweite, ein sog. Brillenglaskondensor, oder, nach Abnahme des Frontteiles, der untere Teil eines Kondensors nach *Abbe*. Durch Heben und Senken des Kondensors — bei bereits scharf eingestelltem Weg — legt man das Lichtquellenbild in die Objektivöffnung und nun stellt man mit der großen Irisblende die passende Größe desselben im Objektiv und die richtige Öffnung der beleuchtenden Büschel her. Die Fig. 64 zeigt recht deutlich den Unterschied bei richtiger und zu großer Öffnung der beleuchtenden Kegel. Als Objekt diente ein Bleistiftstrich auf einer feinen Mattscheibe. Man hat hier nebeneinander zwei Strukturen, eine vornehmlich durch Absorption und eine vornehmlich durch Beugung sichtbare. Der Unterschied ist ohneweiters sinnfällig.

Bei der linken Aufnahme war das Lichtquellenbild wesentlich größer als die Pupille des Objektivs, bei der rechten erfüllte es nur einen für den vorliegenden Fall passenden Teil der Objektivöffnung.

Wir haben zunächst, wie das ja auch im Idealfalle verwirklicht ist, angenommen, daß der Kondensor die Lichtquelle im Objektiv, und dieses die Kondensoröffnung auf dem Schirm abbildet. Es ist selbstverständlich, daß in diesem Falle zu einer bestimmten Objektivbrennweite auch eine bestimmte Kondensorbrennweite gehört. Außerdem muß der Kondensor eine dem Bildwinkel des Objektivs entsprechende Öffnung haben. Gelegentlich ist aber nicht die genau passende Kondensorbrennweite vorhanden, und man muß sich mit einer größeren oder kleineren behelfen. Das hat Abweichungen vom idealen Strahlengang zur Folge, die hier etwas näher besprochen werden sollen.

Es kommt an auf die Brennweite, die numerische Apertur des Objektivs und des Kondensors und den Ort des Lichtquellenbildes.

Fig. 64.



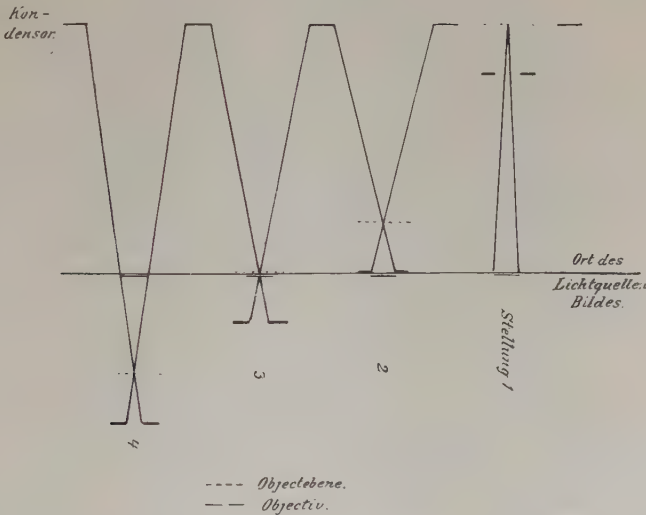
Der Einfluß der Größe des Lichtquellenbildes ist im vorhergehenden schon besprochen. Es bleibt also nur noch außer den Eigenschaften des Kondensors und des Objektivs der Ort des Lichtquellenbildes näher zu besprechen. Eine weitere Vereinfachung ist die Annahme, daß das Bild der Lichtquelle in der hinteren Brennebene des Kondensors liegt. Weiter soll der Abstand des Objektes vom Objektiv als fest, also auch ein bestimmter Abbildungsmaßstab angenommen werden.

Man kommt am einfachsten zum Ziel, wenn man nur eine Versuchsbedingung ändert und alles andere unverändert erhält.

In den vier Fällen der Fig. 65 wandern Objekt und Objektiv in der — immer von links nach rechts — Fortpflanzungsrichtung des Lichtes. Die Brennweite des Kondensors soll erheblich größer sein, als die des Objektivs. Der umgekehrte Fall, daß die Brennweite des Kondensors erheblich kleiner ist, hat in der Praxis keine Bedeutung. Im vorliegenden Falle haben wir vier besonders ausgezeichnete Stellungen. In der Stellung 1 liegt die punktiert angedeutete Objektebene in der Austritts-

pupille des Kondensors. Für die Beleuchtung sowohl, wie für die Abbildung eines Objektpunktes kommen, geometrisch gesprochen, koaxiale Strahlenkegel gleicher Öffnung in Betracht, deren gemeinsame Spitze im Objektpunkt liegt. Ihre Öffnung und Gestalt ist je nach der betreffenden Anordnung durch richtiges Zusammenfassen der von der Kondensoröffnung zum Lichtquellenbild verlaufenden Strahlen zu bestimmen. Natürlich muß man auch die Beziehungen der Objektivöffnung zu diesen Strahlen aus der Lage und Gestalt der Öffnung berücksichtigen. Im Idealfalle, wenn die Objektivöffnung vollkommen vom Bild der Lichtquelle erfüllt ist und das Objekt auf der Kondensoröffnung liegt, schneidet die Objektivöffnung überhaupt nichts von dem kegelstumpfförmigen Raume ab, in dem die vom Kondensor zum Lichtquellenbild

Fig. 65.



gehende Strahlung verläuft. Die strahlenbegrenzende Öffnung ist also die Pupille des Objectives, oder was praktisch dasselbe ist, das Lichtquellenbild, die bildbegrenzende Öffnung ist im Objektraum die Öffnung (Pupille) des Kondensors. Das ist, wie oben gesagt, nur möglich, wenn der Kondensor gut zum Objectiv paßt.

In den vier Fällen der Fig. 66 ist die Brennweite des Kondensors größer als die Objectivbrennweite. Man muß also sowohl für die Büschel, die die Objektpunkte abbilden, wie auch für das Bildfeld (das Büschel der zur Abbildung gelangenden Hauptstrahlen) durch eine besondere Konstruktion die betreffenden Verhältnisse klarlegen. Außerdem wird man noch die sog. „Vignettierung“ der Büschel seitlicher Objektpunkte berücksichtigen.

Wenn wir im Falle Stellung 1 das Lichtquellenbild durch den Objektpunkt in die Objektivöffnung projizieren, sehen wir, daß nur ein

Teil derselben mit direktem Licht erfüllt wird. Wir haben hier also eine der Abblendung des Objektives in gewissem Sinne ähnliche Erscheinung. Wir werden später sehen, daß zwischen der Abblendung und Objektiv und der Verkleinerung des Lichtquellenbildes in seiner Öffnung ein wesentlicher Unterschied besteht.

Die Ausdehnung des Sehfeldes ist ebenfalls leicht zu finden. Man konstruiert den kegelstumpfförmigen Raum, in dem Strahlen von der Kondensoröffnung zum Lichtquellenbild verlaufen, bringt Objekt und Objektiv an ihren Ort und untersucht, welche für die Abbildung der Objektpunkte durch das Objektiv überhaupt in Frage kommenden Büschel vorhanden sind, und welche Gestalt sie haben.

Da die Stellung 1 sich besonders gut zur Darstellung der Sehfeldbegrenzung und auch der Vignettierung eignet, wurden diese Verhält-

Fig. 66.

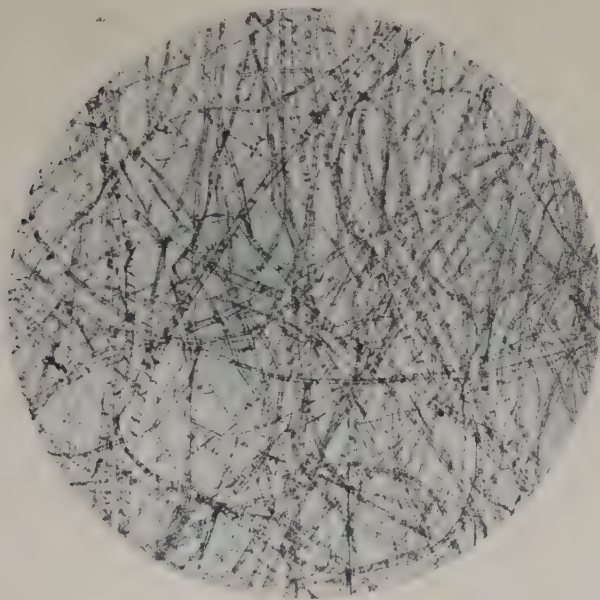


nisse in Fig. 66 übertrieben wiederholt. Der Übersichtlichkeit halber wurde Fig. 65 durch diese Darstellung nicht unterbrochen.

In Fig. 66 liegt, ebenso wie in Stellung 1 der Fig. 65, das Objekt in der Kondensoröffnung. Der besseren Deutlichkeit halber ist die Objektivöffnung etwas größer und weiter weg vom Objekt und der Kondensoröffnung angenommen. Das Lichtquellenbild wurde etwas näher an das Objektiv herangerückt. Wenn wir durch das Lichtquellenbild als perspektivisches Zentrum die Objektivöffnung in die Kondensoröffnung projizieren, bekommen wir in der Einstellebene drei Gebiete, das zentrale Gebiet I, das mit der maximalen, im vorliegenden Falle möglichen Öffnung beleuchtet, und, wenigstens was die primären Maxima angeht, auch abgebildet wird. Das Gebiet II ist das der zunehmenden Vignettierung, und das Gebiet III der Kondensoröffnung wird überhaupt nicht mehr abgebildet. Der Einfachheit und Deutlichkeit halber wurde in Fig. 66 die Konstruktion nur für die untere Hälfte der Abbildung ausgeführt. Für die anderen Stellungen ergibt sich aus dem Gesagten die Konstruktion des Sehfeldes und die Art seiner Abbildung ohneweiters.

Daß man die im Anfang dieser Veröffentlichung als Fehlerquelle bei der Beleuchtung mit durchfallendem Licht erwähnte Dunkelfeldbeleuchtung allein sehr wohl mit Vorteil auch bei der Mikrophotographie mit kurz Brennweitigen photographischen Objektiven anwenden kann, beweisen die Fig. 67 und 68. Fig. 67 ist eine Aufnahme mit durchfallendem Licht, bei der die mittleren zwei Drittel des Objectives mit direktem Licht erfüllt waren, wie das für den vorliegenden Fall die günstigste Bildwirkung ergab. Fig. 68 wurde mit Dunkelfeldbeleuchtung aufgenommen. Als Lichtquelle diente eine Mattscheibe, die von einer Auerlampe durch einen Kondensor hell erleuchtet wurde. In ihrer Mitte

Fig. 67.



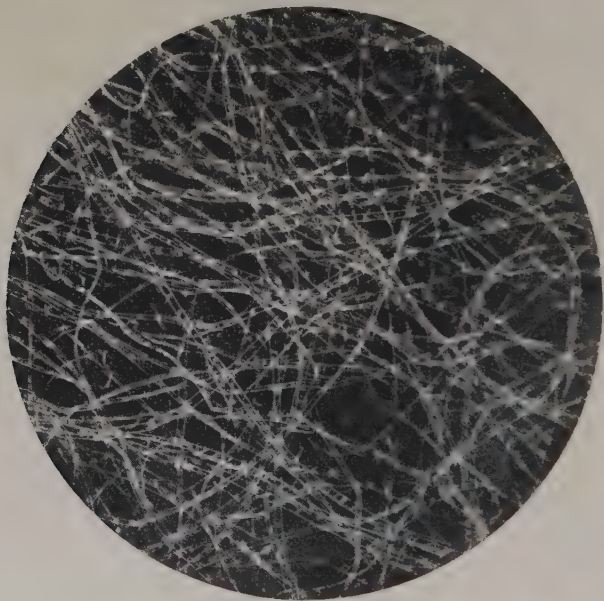
befand sich eine kleine kreisrunde Scheibe aus schwarzem Papier. Diese Mattscheibe wurde so im Objectiv abgebildet, daß das Bild der schwarzen Scheibe eben gerade die Öffnung desselben bedeckte. Das Bild der Mattscheibe war natürlich wesentlich größer als die Objectivöffnung. Die beiden Fig. 67 und 68 stellen ein Stück Josefspapier dar, das in Kanadabalsam eingebettet war.

Derselbe Unterschied wie bei der Hellfeldbeleuchtung besteht auch beim Dunkelfeld zwischen der Beleuchtung für die eigentlichen Mikroskopobjective mit hoher numerischer Apertur, bei denen das Sehfeld klein ist, verglichen mit der Objectivöffnung, und der Beleuchtung für Aufnahmen mit kleinen photographischen Objektiven von kurzer Brennweite, bei denen das Sehfeld groß ist, verglichen mit der Objectivöffnung. In ersterem Falle entwirft der Kondensor ein Bild der Licht-

quelle in der Objektebene (Einstellebene des Objektives). Die Pupille des Kondensors und des Objektives sind einander als Objekt und Bild zugeordnet und stehen miteinander in Beziehung. Man muß also hier die Abblendung für Dunkelfeld in der Pupille des Kondensors anordnen. Bei den kurzbrennweitigen photographischen Objektiven liegt das Bild der Lichtquelle im abbildenden Objektiv und es steht mit dessen Pupille im Wettstreit. Die Abblendung für Dunkelfeld muß also in der Lichtquelle selbst oder in einem Zwischenbild derselben ausgeführt werden.

Streuende Matt- oder Milchglasscheiben werden in der Mikrobeleuchtung häufig benutzt. Die vorliegende Mitteilung soll eine syste-

Fig. 68.



matische Übersicht über die Wirkungsweise und die Verwendungsmöglichkeiten streuender Scheiben bei der besagten Beleuchtung geben. Die Wirkung eines streuenden Mediums ist in Fig. 69 dargestellt. Auf die durchscheinende, vollkommen streuende Scheibe *M* fällt, von links nach rechts verlaufend, ein enges Lichtbüschel ein. In *M* wird dasselbe zerstreut, d. h. aus der einen ursprünglichen Richtung werden viele neue. Die Helligkeitsverteilung in den neuen Richtungen hängt von der Struktur in *M* ab. Wir wollen hier annehmen, daß eine vollkommene Streuung geschieht, d. h. daß in allen Richtungen des ganzen Winkelraumes von $2R$, angedeutet durch den doppelten Kreisbogen, die gleiche Helligkeit vorhanden ist. Der Buchstabe *M* soll in seiner Arbeit eine vollkommen streuende Schicht bedeuten. *M* wird also durch Bestrahlung im besagten Sinne zu einer sekundären Lichtquelle. Die von *M* aus-

gehende Strahlung kann man mit Vorteil für unsere Betrachtung in zweifacher Weise zusammenfassen. Erstens betrachten wir nach Fig. 70 das Strahlenbündel, das von einem Punkte von M (im Sinne der geometrischen Optik) ausgeht. Hiervon war schon im vorhergehenden bei Fig. 69 die Rede. Zweitens untersuchen wir, wie M einen außerhalb von M liegenden Gegenstand bestrahlt. In Fig. 70 wird der in der Ebene E liegende Punkt P von M bestrahlt. Die Öffnung des Bündels, das die gesamte Bestrahlung des Punktes P von M aus enthält, wird bestimmt durch den Winkel, unter dem M , von P aus gesehen, erscheint. Wir haben also zweierlei zu berücksichtigen, erstens die gesamte von einem Punkt (einem Strukturelement) von M ausgehende Strahlung — ich möchte hierfür den Ausdruck „Strukturstrahlung“ vorschlagen — und zweitens die gesamte von M nach einem Punkte außerhalb von M gehende Strahlung, die ich hier die „Flächenstrahlung“ von M nennen will. Die

Fig. 69.

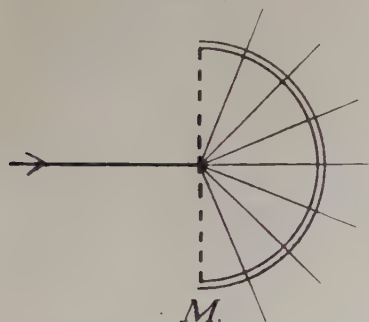
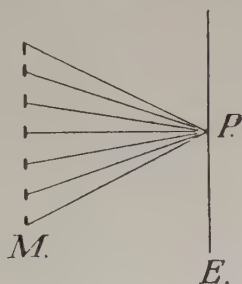


Fig. 70.



Bedeutung der Flächenstrahlung für unseren Fall zeigt Fig. 71. In EE befindet sich ein mikroskopisches Objekt, das von einem Objektiv abgebildet wird, dessen beide Pupillen der Einfachheit halber als zusammenfallend durch die Öffnungen in O dargestellt sind. EE wird in Fig. 71a von einer großen, in b von einer kleinen M bestrahlt. Die Öffnung, die die Punkte in EE bestrahlenden und ebenso der durch EE direkt in das Objektiv gelangenden Bündel ist abhängig von der Größe von M und außerdem von dem Abstand $M-E$. Wenn man die kleine M im Falle b genügend nahe an EE heranbringt, kann man dieselbe Öffnung der Bündel erhalten wie im Falle a . Dieser Fall hat für die Beleuchtung mikroskopischer Objekte eine gewisse Bedeutung. Wie ohneweiters aus Fig. 71 hervorgeht, kann M einen Kondensor vertreten. Man kann sich leicht praktisch auf folgende Weise hiervon überzeugen. Man nimmt den Kondensor aus dem Mikroskop heraus und arbeitet am besten mit Bogen- oder Sonnenlicht. Um eine Blendung des Auges zu verhüten, legt man über das Okular Grauschiben. Den Träger des Abbesehen Beleuchtungsapparates senkt man mit seinem Trieb so weit, daß man zwischen Kondensorhülse und Tisch bequem die streuende Scheibe ein-

schieben kann. Wenn man runde, streuende Scheiben von passender Größe hat, kann man sie auch in den Blendenträger des Beleuchtungsapparates legen. Nun beobachtet man einmal im parallelen Licht ohne M , das andere Mal mit eingelegtem M . Im letzteren Falle muß man mit Hilfe der Kondensor-Iris das beleuchtete Stück von M passend abgrenzen. Man sieht bei herausgenommenem Okular, wieviel von der Objektivöffnung mit direktem Licht erfüllt ist, und stellt bei eingesetztem Okular am Bilde selbst die günstigste Blendenöffnung fest. Alle Objekte, für die eine größere Öffnung der beleuchtenden Büschel nötig ist, zeigen die Wirkungen von M gut, z. B. feine, stark gefärbte Bakteriengeißeln, Granula und andere feine absorbierende Objekte. Selbst die Wirkung des Immersionskondensors kann man mit einer M erreichen, wenn man

Fig. 71.

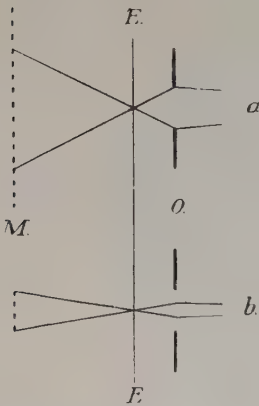
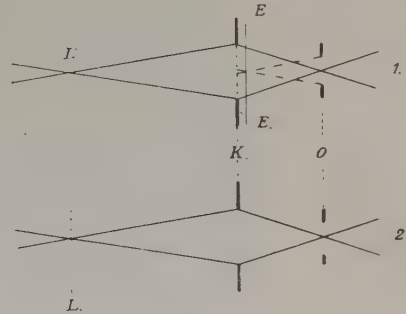


Fig. 72.



dieselbe auf den Tisch legt, den Objektträger direkt auf sie und beide mit einem Tropfen Zedernholzöl verbindet. Hier muß man entweder eine Milchglasscheibe nehmen, die in ihrer ganzen Dicke streut, oder, wenn man eine Mattscheibe nimmt, muß die klare Seite nach oben zu liegen kommen und mit dem Objektträger durch das Immersionsöl verbunden werden, damit das Öl nicht die Streuung aufhebt. Auch Objekte, deren Struktur besonders durch Beugung sichtbar wird, wie Diatomeenschalen, zeigen in gewissen Fällen die Wirkung von M recht deutlich. Bei der Mikrophotographie mit kurzbrennweitigen photographischen Objektiven, z. B. mit Planaren, ist die Wirkung einer M besonders wichtig und auch nach Fig. 72 recht leicht verständlich. In Fig. 72 liegt die wiederum punktiert angedeutete Mattscheibe in der mit K bezeichneten Austrittspupille des Kondensors, und das Objekt liegt im Sinne der Lichtbewegung, dicht hinter M und K in EE . Sie bewirkt also, daß das ganze Objektiv in O mit Licht erfüllt wird, und daß seine ganze Öffnung für die Abbildung ausgenutzt wird. Diese Anordnung ist be-

sonders dann von Bedeutung, wenn man eine genügend helle Lichtquelle zur Verfügung hat. Nun kann eine M für alle kurzbrennweitigen Objektive die verschiedenen Kondensoren ersetzen. Dies geht bereits aus der Fig. 72 hervor. Man kann also im Falle 1 der Fig. 2 den Kondensor einfach weglassen, und man hat nur dafür zu sorgen, daß die M in genügender Ausdehnung gleichmäßig beleuchtet ist.

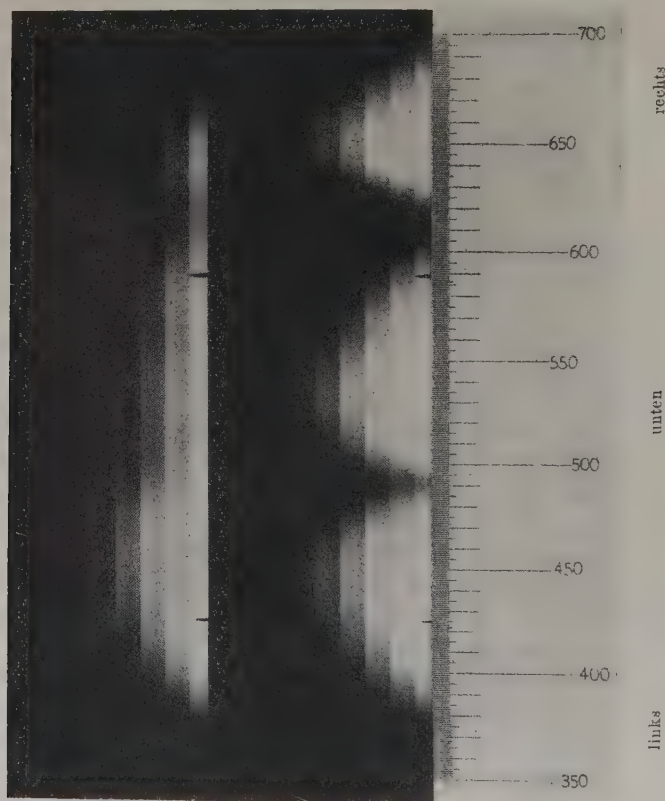
Dies ist von einer gewissen praktischen Bedeutung, denn man muß für die verschiedenen Objektivbrennweiten auch die passenden Kondensorbrennweiten nehmen und den Kondensor richtig zum Objektiv justieren. Diese allerdings geringen Schwierigkeiten fallen bei der Anwendung der M fort. Die Bildhelligkeit ist hier gering, besonders bei stärkeren Vergrößerungen; wenn man aber Bogenlicht hat, ist dieselbe für die schwächeren und mittleren Brennweiten der kurzbrennweitigen photographischen Objektive für die Mikrophotographie noch recht wohl genügend und gerade hier macht die Kondensorfrage manchmal Schwierigkeiten. Bei den kürzeren Brennweiten dieser Objektivgruppe und stärkeren Vergrößerungen kann man die Frontlinse des Kondensors abschrauben und den unteren Teil desselben allein benutzen. In 2 liegt M in L' . In beiden Figuren ist angenommen, daß, wie das in der Tat der Fall ist, vor dem Kondensor nicht die Lichtquelle selbst, sondern ihr Bild liegt. Es ist also möglich, in L' eine Mattscheibe aufzustellen. In diesem Falle vermindert M nur die Bildhelligkeit, weil durch die Streuung ein Teil des von L' nach dem Kondensor zielenden Lichtes an K vorbeigeführt wird. Die Öffnung der abbildenden Büschel wird im Falle 2 nicht beeinflußt.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß zwei Anwendungsformen der M zu unterscheiden sind; im ersten Falle ist die Strukturstrahlung, im andern die Flächenstrahlung das für die Anordnung Wirksame. Die erstere kann zur reinen Lichtschwächung ohne Nebenwirkung benutzt werden, wie das in Fig. 72 oben (1) dargestellt ist, die andere zu gewissen Änderungen im Strahlengang der Beleuchtung, wobei immer als Nebenwirkung eine Helligkeitsverminderung erfolgt. Wenn M konjugiert zur Pupille des abbildenden Objektives liegt, steht die Winkelgröße von M , gesehen vom Objektpunkt aus, im Wettstreit mit der Winkelgröße der Eintrittspupille von demselben Punkt aus gesehen. Selbstverständlich kommen häufig Zwischenstellungen der M vor, bei denen sie weder in der Lupe noch in der Pupille, sondern irgendwo zwischen beiden steht. Eine einfache geometrische Überlegung gibt nach dem Gesagten Aufschluß über die Wirkung von M in einer solchen Stellung.

Sowohl für die Mikrophotographie als auch für subjektive Beobachtung ist es oft zweckmäßig, die Objekte mit mehr oder weniger engbegrenzten Spektralbezirken zu beleuchten. Man kann eine Lichtquelle anwenden, die ein Linienspektrum gibt, etwa eine Quecksilberdampflampe, und durch geeignete Lichtfilter eine Linie isolieren. Neuerdings wird vom Zeiß-Werk eine Quecksilberdampflampe für Mikroskopie

mit Lichtfiltern nach Dr. Köhler geliefert. Diese Lampe ist besonders für die subjektive Beobachtung gebaut, sie gibt das helle Licht der grünen Quecksilberlinie. Für Lichtquellen, die nur einige ziemlich weit im Spektrum auseinanderliegende helle Linien aussenden, braucht man nur verhältnismäßig schwach gefärbte Lichtfilter. Lichtquellen, in denen ein Körper glüht, senden ein kontinuierliches Spektrum aus. Zurzeit sind fast nur solche Lichtquellen im Gebrauch, Petroleumlicht,

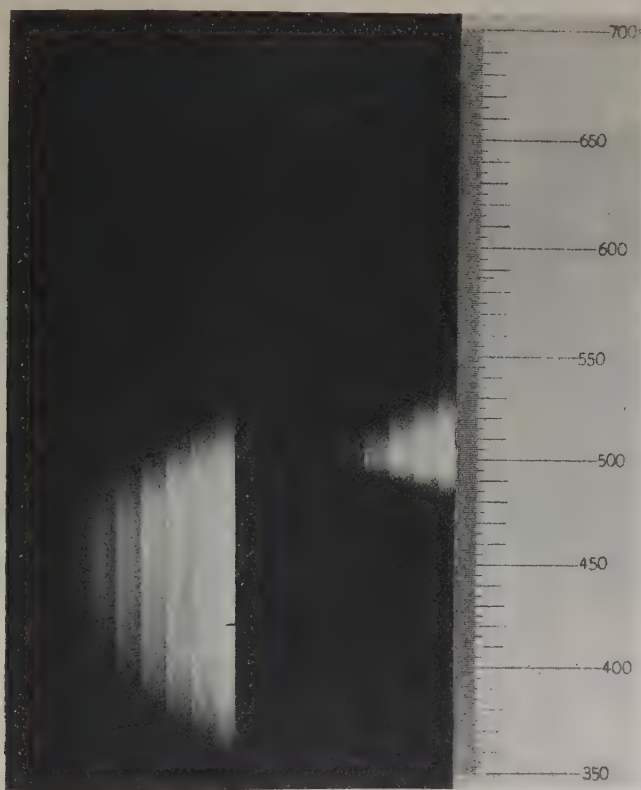
Fig. 73.



Gasglühlicht, Kalklicht, elektrische, Kohlenfaden-, Nernst- und Metallfadenlampen und Bogenlicht. Aus dem kontinuierlichen Spektrum dieser Lichtquellen muß man die betreffenden Spektralbezirke mit geeigneten Farbfiltern isolieren. Die Farbfilter sollen einen möglichst scharf begrenzten Spektralbezirk durchlassen. Für diesen müssen sie so durchsichtig wie möglich sein. Für die anderen Spektralbezirke dagegen sollen die Farbfilter möglichst undurchlässig sein. Ein Filter, das für gewisse Spektralbezirke praktisch undurchlässig ist, muß eine ziemlich tiefe Färbung haben. Das bringt aber leider fast immer mit sich, daß es auch

seine Eigenfarbe nur zum Teil durchläßt, also für diese ebenso wirkt wie eine Grauscheibe. Je heller die Spektralgebiete sind, die absorbiert werden sollen, verglichen mit der Intensität des in der Beleuchtung vorhandenen Lichtes, das nicht absorbiert werden soll, desto tiefer muß die Färbung des Farbfilters sein. Weiter ist zu bemerken, daß bei Farbfiltern das absorbierte Spektralgebiet nicht ganz scharf gegen das durchgelassene abgesetzt ist. Der Übergang ist ein mehr oder weniger allmäh-

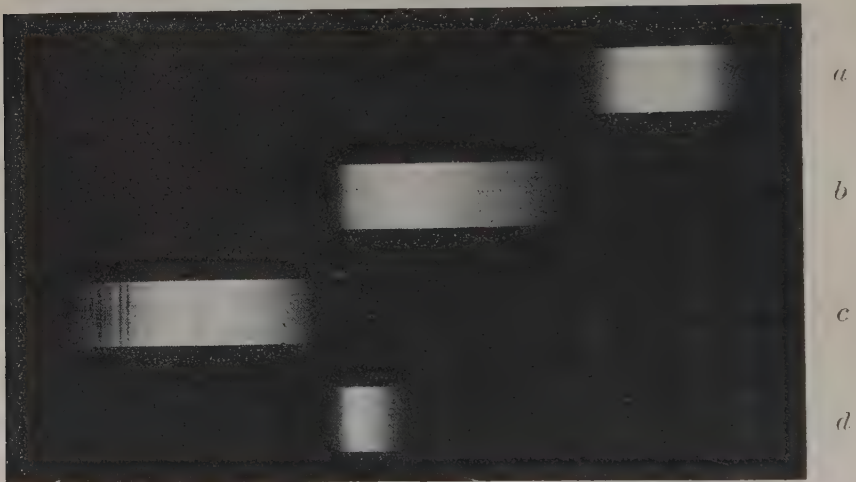
Fig. 74.



licher, wie das die Fig. 73—76 zeigen. Die Grenzen werden durch die Belichtung verschoben. Je länger man belichtet, desto breiter wird das Gebiet der durchgelassenen Farben. Aus den dieser Arbeit beigegebenen Spektralaufnahmen ist das ohneweiters zu ersehen. Das untere Band ist bei diesen Aufnahmen immer doppelt so stark belichtet wie das darauffolgende nächsthöhere. Eine derartige Einrichtung gibt auf einen Blick ein Bild über die relative Farbenempfindlichkeit der lichtempfindlichen Schichten, u. zw. gestattet sie eine für praktische Zwecke durchaus genügend genaue Ablesung direkt aus dem Negativ. Aus diesen Bildern

sowohl wie auch aus der Beschaffenheit der Gradationskurven der photographischen Schichten folgt, daß man sich bemühen soll, möglichst richtig zu belichten, d. h. gerade ebensolang als nötig, aber nicht länger. Der vorliegende Filtersatz für Mikrophotographie besteht aus einem roten, einem gelben, einem grünen und einem blauen Filter aus Jenaer Farbglas. Die Spektrogramme zeigen die Wirkung der Filter im Spektrum. Fig. 73 besteht aus Aufnahmen auf Wratten & Wainwright Panchromatic Plates. Fig. 73 oben ist eine Spektralaufnahme ohne Filter. Sie zeigt, daß die Platte vier deutlich ausgeprägte Maxima hat, die im Blau, Grün, Gelb und Rot liegen. Zwischen diesen Maximis liegen Minima, die als Einsenkungen im Gegensatz zu den Gipfeln wohl er-

Fig. 75.

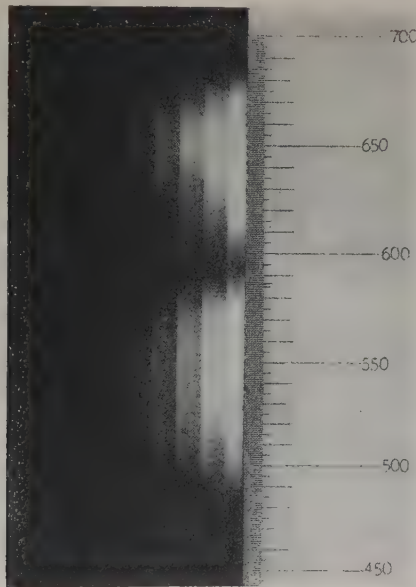


kennbar sind. Fig. 73 unten links zeigt die Wirkung des Blaufilters. Fig. 73 unten Mitte die des Grünfilters zusammen mit dem Gelbfilter und Fig. 73 unten rechts die des Rotfilters. Natürlich hängt die Gestalt der Absorptionskurve auch von der relativen Farbenempfindlichkeit der lichtempfindlichen Schicht ab. Je weniger die Platte für die Eigenfarbe des Filters empfindlich ist, verglichen mit ihrer Lichtempfindlichkeit für die vom Filter absorbierten Farben, desto tiefer muß das Filter gefärbt sein, ähnlich wie das oben für die relative Helligkeit der von der Lichtquelle ausgesandten Farben gesagt wurde. Lücken im Spektrum der Schicht können das Absorptionsbild des Filters unter Umständen verändern. Man kann hiervon mit Vorteil Gebrauch machen.

Für die meisten Zwecke der Praxis genügt es, mit grünem oder blauem Licht zu photographieren. Die beste Rotempfindlichkeit für das langwellige Rot haben, soweit bisher bekanntgeworden ist, die panchromatische Platte von Wratten & Wainwright und die Pinacyonal-

Badeplatte von Westendorp & Wehner. Sie werden also in Verbindung mit dem Rotfilter in erster Linie anzuwenden sein, wenn man mit dem äußersten Rot Aufnahmen zu machen hat. In der Praxis wird das selten vorkommen. Meist wird man wohl solche Aufnahmen machen, um das verminderte Auflösungsvermögen bei rotem Licht zu zeigen. Ein strenges, aber lichtschwaches Grünfilter bekommt man, wenn man eine Blauscheibe mit der Gelbscheibe kombiniert. Hierfür wird eine etwas dünnere Blauscheibe geliefert, die zugleich für die subjektive Beobachtung dient. Diese Scheibe läßt den kurzwelligen Teil des Grün noch durch. Das Blau wird von der Gelbscheibe vollkommen zurückgehalten.

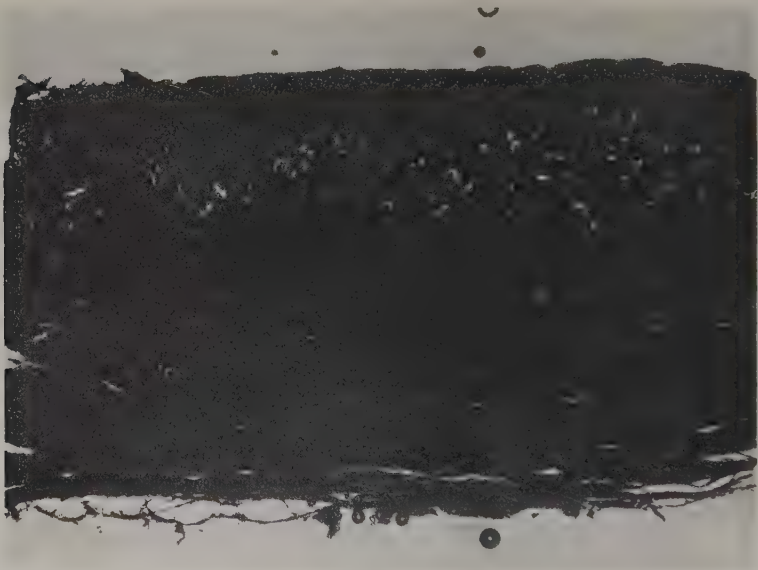
Fig. 76.



Dieses strenge Grün wird aber nur in seltenen Fällen notwendig sein. Ein ebenfalls sehr strenges Grün, u. zw. wiederum den kurzwelligen Teil des Grün, bekommt man, wenn man eine gewöhnliche, nicht farbenempfindliche Platte hinter einem strengen Gelbfilter belichtet. Die Eigenempfindlichkeit dieser Platte reicht nur bis ins Grün, und das Gelbfilter absorbiert alles blaue Licht. Fig. 74 zeigt das Ergebnis einer derartigen Versuchsanordnung. Natürlich muß man in diesem Falle ziemlich lange belichten. Die vier Spektren der Fig. 75 sind mit Sonnenlicht aufgenommen, *a* mit dem Rotfilter, *b* mit dem Grünfilter (grün-gelb) und *c* mit dem Blaufilter; *d* ist eine Aufnahme hinter einem Grünfilter, bestehend aus dem Blau- und dem Gelbfilter. Fig. 76 zeigt die Wirkung eines etwas dünneren Rotfilters als des im Satz befindlichen auf zwei verschieden far-

benempfindliche Emulsionen. Der rechte, im tiefen Rot bei 650 liegende Gipfel gehört der Wratten & Wainwright panchromatischen Platte an, der linke ungefähr bei 565 liegende Gipfel der Chromoplatte. Das Filter war so gewählt, daß es für die Wratten & Wainwright-Platte gerade noch ausreichte. Man sieht, daß man zu den Filtern auch die passenden Trockenplatten benutzen muß. Wie oben gesagt, schwächen die Farbglassfilter auch ihr Eigenmaximum ähnlich wie Grauscheiben. Die blaue Scheibe läßt ungefähr ein Drittel des Maximums ihrer Eigenfarbe durch, die grüne in Verbindung mit der gelben ein Viertel und die rote Dreiviertel. Die Gelbscheibe allein schwächt das Licht ihrer Eigenmaxima,

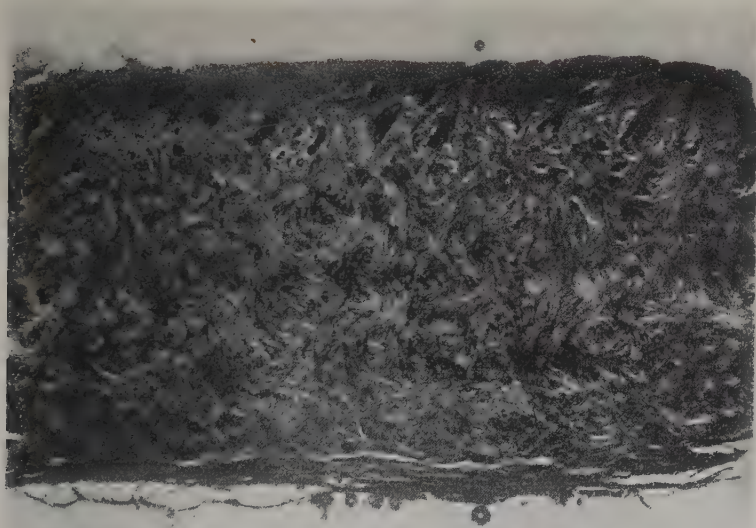
Fig. 77.



die das rote, grüne und gelbe Gebiet des Spektrums umfassen, nur unwesentlich. Die Belichtungszeiten können hier nicht allgemein gültig angegeben werden, sie ändern sich mit der Farbe der Lichtquelle, den Eigenschaften der lichtempfindlichen Schicht und der Beschaffenheit des Präparates. Die allgemeinen Regeln für die Anwendung der Lichtfilter sind: Man photographiere auf Schichten, die ein gut ausgeprägtes Maximum der Empfindlichkeit entsprechend dem Maximum der Lichtdurchlässigkeit des angewandten Filters haben. Für Kontrastwirkungen photographiere man mit der Farbe, die vom Präparat absorbiert wird. Außer als Kontrastfilter können die Lichtfilter auch noch als Detailfilter benutzt werden. Dicke Präparate, die stark gefärbt sind und nur einen verhältnismäßig engbegrenzten Spektralbezirk durchlassen, gehen mit

weißem Licht oder einer Farbe, die sie absorbieren, durchleuchtet, wenig oder gar keine Einzelheiten ihrer Struktur. Wenn man dagegen solche Präparate mit ihrer Eigenfarbe durchleuchtet, bekommt man recht gute Strukturbilder. Die Fig. 77—80 zeigen die Wirkung der Kontrast- und der Detailfilter. Fig. 77 und 78 sind Bilder eines dicken, stark gelb, fast braun gefärbten Lederschnittes. Fig. 77 ist eine Aufnahme mit blauem Licht auf eine gewöhnliche, nicht farbenempfindliche Trockenplatte. Bei dieser Versuchsanordnung ist es auf keine Weise möglich, mehr Einzelheiten zu bekommen, auch nicht bei sehr langen oder sehr starken Belichtungen. Das Bild bleibt aus hier nicht näher zu

Fig. 78.



erörternden Gründen vollkommen detaillos. Fig. 78 ist eine Aufnahme mit der Eigenfarbe (Gelb und Orange) des Präparates auf eine entsprechend farbenempfindliche Schicht. Fig. 79 und 80 sind Aufnahmen eines wesentlich dünneren Schnittes durch dasselbe Leder. In dünner Schicht sieht das Leder zart hellgelb gefärbt aus. Fig. 79 ist mit der Eigenfarbe des Leders aufgenommen und Fig. 80 mit einem Kontrastfilter, dem Blaufilter. Hier hat das Detailfilter ein sehr flaves, das Kontrastfilter dagegen ein gutes Bild gegeben. Aus den Fig. 77—80 geht ohneweiters hervor, in welchen Fällen ein Kontrastfilter zu wählen ist und in welchen Fällen ein Detailfilter. In der Praxis findet man das passende Filter auf einfache und sichere Weise, wenn man das Präparat nacheinander mit den verschiedenen Filtern betrachtet. Für dünne und

schwach gefärbte Präparate ist dasjenige Filter das beste, welches die Einzelheiten möglichst schwarz auf dem hellen farbigen Grunde zeigt.

Fig. 79.

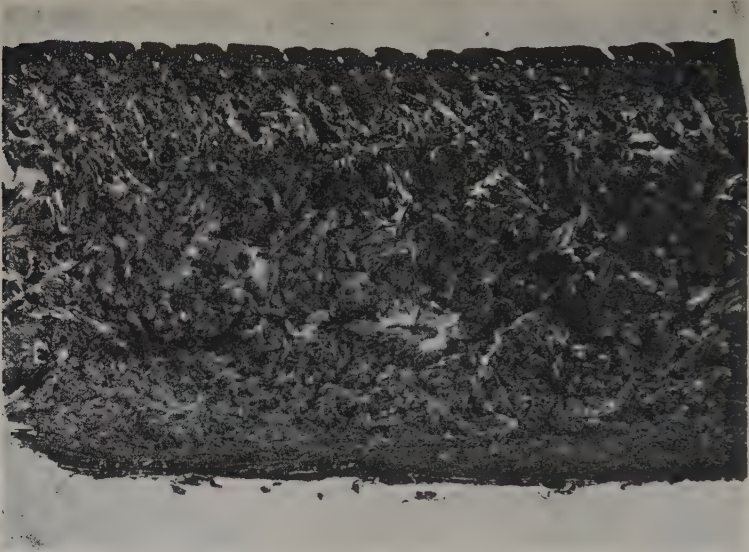
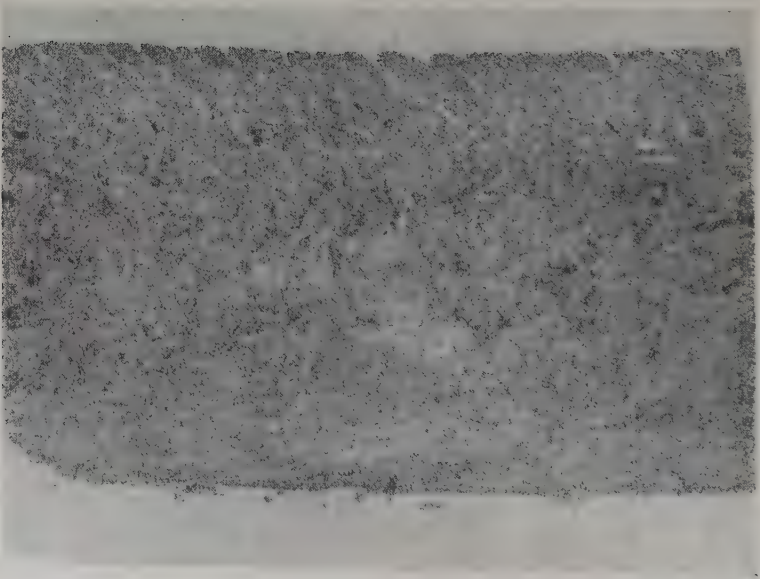


Fig. 80.



Für dicke und schlecht durchsichtige Präparate nimmt man Filter, die möglichst viel Einzelheiten im Präparat zeigen, also Filter, deren Farbe

der Eigenfarbe des Präparates möglichst nahekommmt. Für die Praxis ist noch zu bemerken, daß der Blaustich der Färbung der Präparate dem ungeübten Auge häufig entgeht.

Auch Versuche über das Auflösungsvermögen können mit dem Farbfiltersatz angestellt werden, u. zw. sowohl bei subjektiver Beobachtung wie auch mit Hilfe der Mikrophotographie. Man wählt hierzu zweckmäßig farblose Objekte mit feiner Struktur, etwa Diatomeenschalen, u. zw. im betreffenden Falle eine Schale, die mit blauem Licht eben gerade aufgelöst wird. Hiervon überzeugt man sich, indem man das Okular aus dem Tubus herausnimmt und die hintere Brennebene des Objektivs beobachtet. Am Rand der Öffnung darf nur der blaue Teil der beiden ersten Seitenmaxima bei gerader Beleuchtung zu sehen sein und bei schiefer der blaue Teil des ersten Seitenmaximums auf der einen Seite, während der rote Teil schon außerhalb der Öffnung liegt. Das rote Filter läßt den blauen Teil der Seitenmaxima verschwinden, und die Struktur wird mit rotem Licht nicht mehr aufgelöst. Die Diatomeentestplatte des Herrn Möller in Wedel ist für diese Versuche recht geeignet.

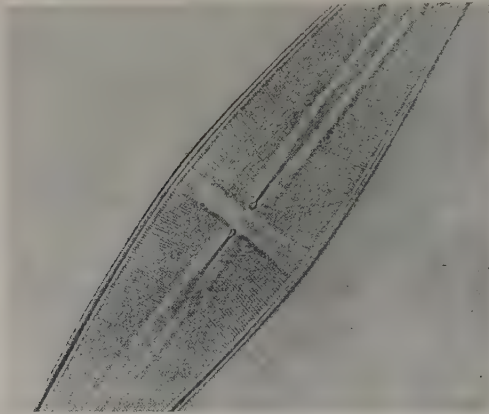
Fig. 81 ist eine Aufnahme von *Stauroneis Phoenicenteron* mit rotem Licht, Fig. 82 eine ebensolche mit blauem Licht. Außer der Farbe des Lichtes blieben alle Versuchsbedingungen unverändert. Für die subjektive Beobachtung sind die Farbfilter gelegentlich recht zweckmäßig. In diesem Falle kann das Grünfilter ohne Gelbfilter benutzt werden, da der verhältnismäßig kleine Teil des blauen Lichtes, den das Grünfilter durchläßt, vom Auge nicht wahrgenommen wird. Für die subjektive Beobachtung können Farbscheiben benutzt werden, die wesentlich heller sind als die für Mikrophotographie bestimmten. Sie müssen aber immerhin mit hellen Lichtquellen, etwa Grätzinlicht oder noch helleren Lampen benutzt werden. Die Filter für Mikrophotographie sind so lichtdurchlässig gehalten, wie das für die vorliegenden Zwecke zulässig ist. Trotzdem geben sie auch unter schwierigen Verhältnissen eine genügend strenge Absorption. Von der Erwägung ausgehend, daß diese Filter nicht nur für eine oder zwei bestimmte Plattensorten und für eine bestimmte Lichtquelle dienen sollen, sondern daß sie möglichst allgemein verwendbar sind, mußte ihre Dichtigkeit so gewählt werden, daß sie bei zweckmäßiger Anwendung für alle im Handel vorkommenden Plattensorten genügt. Die Verlängerung der Belichtungszeiten durch diese Filter bleibt durchaus in den Grenzen des Zulässigen.

Die hier als besonders gutes Beispiel eingehend beschriebenen Filter aus optischem Glas sind zwar, besonders in einem Satz von je drei Stück in passend abgestufter Dichte, die eine ganze Reihe von Kombinationen geben, sehr weitgehend brauchbar, und sie reichen für alle praktisch vorkommenden Fälle aus. Diese Filter sind aber teuer und schwer zu bekommen. Man kann dasselbe mit Anilinfarben erreichen, deren Lösung man in Gefäßen mit planparallelen Wänden in den Strahlengang ein-

schaltet. Sowohl durch Änderung der Konzentration, wie auch durch Kombination verschiedener Farben kann man sehr viel erreichen.

Wenn auch die Objektbeleuchtung und die Anordnung des Objektes für sich allein nicht alles in der Mikrophotographie ausmacht und be-

Fig. 81.



deutet, so ist eine richtige Beleuchtung und Anordnung des Objektes etwa nach den in dieser Abhandlung gegebenen schematischen Zusammenstellungen und sonstigen Anleitungen die erste und Haupt-

Fig. 82.



bedingung für das Zustandekommen eines brauchbaren Bildes, sowohl für die subjektive Beobachtung wie in gewissem Sinne noch viel mehr für die Mikrophotographie, da bei dieser kein Fehler „übersehen“ werden kann, sondern alles, was im optischen Bilde enthalten ist, in der Photographie auch wieder erscheint.

Der rein photographische Teil der Mikrophotographie unterscheidet sich in nichts von der gewöhnlichen Photographie, und man kann in jedem guten Lehrbuch der gewöhnlichen Photographie alles finden, was man braucht, um von einem richtig auf der Mattscheibe eingestellten optischen Bild zum photographischen Papier- oder Glasbilde zu kommen. Ich halte es für falsch und für ganz unzweckmäßig, hier in Kürze einige Vorschläge zu machen, die entsprechend dem geringen Raume, der hierfür nur zur Verfügung gestellt werden kann, nur ganz oberflächlich und lückenhaft sein könnten. Das, was von der farbigen Beleuchtung der Objekte zu sagen war, wurde bereits vorweggenommen, und um Wiederholungen zu vermeiden, gleich im Zusammenhang mit dem Gebrauch farbenempfindlicher Schichten besprochen.

Im folgenden soll mehr auf das hingewiesen werden, was der Mikrophotograph ganz besonders berücksichtigen muß. Aber eine gründliche Kenntnis der allgemeinen Photographie muß vorausgesetzt werden, und ich möchte hier ganz besonders eindringlich darauf hinweisen, daß die unbedingt notwendige Vorbedingung für einen guten Mikrophotographen eine sehr gründliche und vollständige Kenntnis der gewöhnlichen Photographie ist. Leider findet man derartige Kenntnisse, von einigen rühmlichen Ausnahmen abgesehen, sehr selten. Eine große Anzahl von Mikrophotographen weiß von der eigentlichen Mikrophotographie nicht viel mehr, als einige — sog. Küchenrezepte.

Von der Lichtempfindlichkeit oder der sog. absoluten Empfindlichkeit ist nur zu sagen, daß sie für die allermeisten Aufgaben der Mikrophotographie von ziemlich untergeordneter Bedeutung ist. Im allgemeinen sind Schichten von allzu hoher Empfindlichkeit durchaus nicht die günstigsten. In vielen Fällen, wo es besonders auf die Wiedergabe sehr feiner Bildeinzelheiten ankommt, sind weniger lichtempfindliche, sog. photomechanische oder Reproduktionsplatten viel günstiger. Nur bei Momentaufnahmen, einerlei, ob sie einzelne oder Reihenaufnahmen (Kinematogramme) sind, ist höchste Lichtempfindlichkeit erforderlich.

Die relative Helligkeitswiedergabe, d. h. die Art, wie zunächst im Negativ und dann im fertigen Bilde die relativen Objekthelligkeiten, wie sie das optische Bild zeigt, wiedergegeben werden, hängt von der sog. Gradationskurve der lichtempfindlichen Schicht ab. Wie schon gesagt, haben weniger lichtempfindliche Emulsionen meist eine für Mikrophotographie besser geeignete Gradationskurve.

Die Farbenwiedergabe im Schwarz-Weißbild besteht darin, daß die subjektiven Helligkeiten der verschiedenen Farben ungefähr richtig, d. h. so wie sie das Auge wahrnimmt, wiedergegeben werden. Hierzu braucht man sog. farbenempfindliche Negativemulsionen, die meist noch in Verbindung mit besonderen Lichtfiltern benutzt werden.

Die Wiedergabe der Struktur des optischen Bildes in ihren Feinheiten hängt von der Streuung des Lichtes in der Negativschicht und ihren

Folgen ab. Hierüber haben *Goldberg* und *Scheffer* eingehende Untersuchungen angestellt.

Mit der Streuung in der Emulsion hängen auch die verschiedenen Formen der Lichthofbildungen zusammen. In Fällen sehr starker Helligkeitsgegensätze muß man unbedingt lichthoffreie Platten anwenden, aber es ist auch in Fällen weniger großer Helligkeitsgegensätze von Vorteil, lichthoffreie Schichten zu benutzen. Über die Entwicklung und das Herstellen von Positiven findet man in jeder Anleitung und Gebrauchsanweisung gute und zuverlässige Vorschriften.

Als Verschlüsse stehen sog. Objektiv- und auch Schlitzverschlüsse zur Verfügung. Die ersteren haben eine pupillenähnliche Wirkung, d. h. sie belichten alle Teile des Bildes zu gleicher Zeit, während die sog. Schlitzverschlüsse verschiedene Bildteile nacheinander belichten. Aus mechanischen Gründen erreicht man mit den Schlitzverschlüssen erheblich kürzere Belichtungszeiten.

Die Mikrokinematographie.

Von Prof. Dr. W. Scheffer, Berlin.

Das Wesen der Kinematographie darf hier als bekannt vorausgesetzt werden. Für die Mikrokinematographie ist von besonderer Bedeutung, daß man das Bild auf der lichtempfindlichen Schicht während der ganzen Aufnahme bequem und deutlich sehen kann.

Dieser Forderung wird in der Kinematographie dadurch genügt, daß man mit Hilfe besonderer Betrachtungslupen und -Einrichtungen die lichtempfindliche Schicht und das auf ihr liegende Bild während der Aufnahme fortwährend bequem betrachten kann, ohne daß falsches Licht zur Schicht gelangen und ohne daß die Betrachtung irgend sonstwie störend wirken kann, etwa dadurch, daß man leicht an den Apparat anstößt und so Verwacklungen u. s. w. verursacht.

Nur auf diese Weise kann man scharfe und genau in der Mitte des Bildfeldes liegende Aufnahmen bekommen, u. zw. mit Sicherheit.

Sonst unterscheidet sich die Mikrokinematographie praktisch in nichts von der gewöhnlichen Kinematographie. Daß es auch hier darauf ankommt, daß die Präparate technisch in jeder Hinsicht vollkommen und auf das beste beleuchtet sind, ist selbstverständlich.

Neben der „natürlichen“, d. h. orthochromen Wiedergabe kann man natürlich mit Hilfe der „Zeithupe“ auch noch Analysen besonders schneller oder sehr langsamer Bewegungen ausführen.

Projektion (Makro-, Mikroprojektion).

Von Dr. M. Berek, Wetzlar.

Mit 11 Textabbildungen.

Einteilung. Die Projektionsarten pflegt man nach der Art der Beleuchtungsanordnung und nach der Größe des zu projizierenden Objekts zu bezeichnen. Man unterscheidet im wesentlichen:

1. Episkopische Projektion: Projektion undurchsichtiger Objekte unter Beleuchtung mit auffallendem Licht.

2. Diaskopische Projektion: Projektion durchsichtiger und durchscheinender Objekte im durchfallenden Licht.

a) Makroprojektion: Diaskopische Projektion großer Objektfelder unter schwacher Vergrößerung;

b) Mikroprojektion: Diaskopische Projektion kleiner Objektfelder unter starker Vergrößerung.

Das optische System, welches die Abbildung des Objekts auf dem Projektionsschirm vermittelt, heißt Projektionssystem, seine Entfernung von der Projektionswand Projektionsweite. Zur Beleuchtung des Objekts dient eine künstliche Lichtquelle in Verbindung mit dem optischen Beleuchtungsapparat.

Allgemeine Aufgaben des Beleuchtungsapparates. Der Beleuchtungsapparat hat zwei Aufgaben zu erfüllen: Ein Objektfeld von bestimmter Größe zu erleuchten und die einzelnen Punkte des Objektfeldes mit Strahlenbündeln gewisser Öffnung (Apertur) zu erleuchten. Beide Aufgaben sind nicht unabhängig voneinander erfüllbar, und der Grad, bis zu dem ihnen gleichzeitig Rechnung getragen werden kann, hängt ab von der Größe der Lichtquelle und von der Apertur des Kollimators. Unter einem Kollimator verstehen wir denjenigen, der Lichtquelle zunächst stehenden Teil des Beleuchtungssystems, der von der Lichtquelle ein Bild in großer Entfernung entwirft (Fig. 83). Der Kollimator kann als Linsensystem oder Hohlspiegel ausgebildet sein. Die Apertur des Kollimators wird definiert:

(1) Apertur = $\frac{\text{halber Durchmesser des Kollimators}}{\text{Brennweite des Kollimators}}$. Zwischen Apertur und

der sog. relativen Öffnung besteht der Zusammenhang:

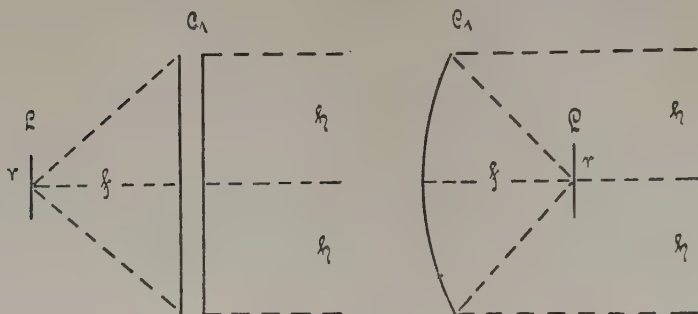
$$\text{Relative Öffnung} = 1 : \frac{f}{2h} = 2 \times \text{Apertur}.$$

Die Lichtquellengröße und die Kollimatorapertur stehen nun in einer sehr einfachen Beziehung zu der Größe des erleuchteten

Objektfeldes und zu der Beleuchtungsapertur im Objektfeld. Unter Voraussetzung aplanatischer Strahlenvereinigung im Objektfeld ist nämlich (Fig. 84) sehr angenähert:

(2) Objektfelddurchmesser \times numerische Apertur

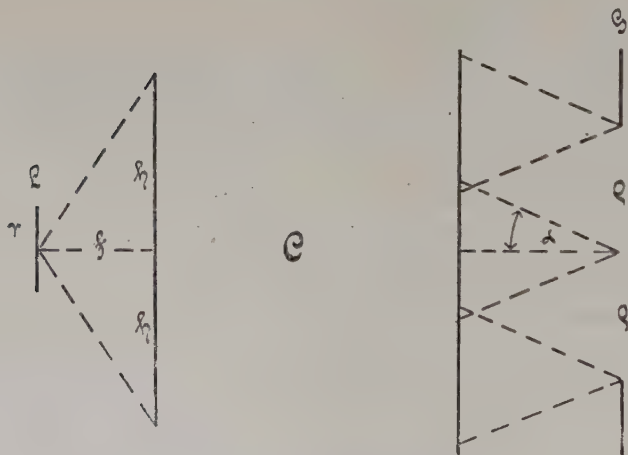
Fig. 83.



Apertur des Kollimators.

L = Lichtquelle, r = Radius der Lichtquelle, C_1 = Kollimator, $2h$ = Durchmesser der Kollimatoröffnung, f = Brennweite des Kollimators, Apertur = $\frac{h}{f}$.

Fig. 84.



Leistung des Beleuchtungsapparates.

L = Lichtquelle, r = Radius der Lichtquelle, f = Brennweite des Kollimators, $2h$ = Durchmesser des Kollimators, C = Gesamtes Beleuchtungssystem, G = Objektfeld, 2ρ = Durchmesser des beleuchteten Objektfeldes, α = halber Öffnungswinkel der Objektfeldbeleuchtung.

Ist n der Brechungsindex im Objektfeld, so bezeichnet man das Produkt $n \sin \alpha = A$ als numerische Apertur der Objektfeldbeleuchtung.

Leistung des Beleuchtungsapparates $2\rho A = 2r \frac{h}{f}$.

der Objektfeldbeleuchtung = Lichtquellendurchmesser \times Kollimatorapertur.

Hiernach kann man bei gegebener Lichtquelle und gegebenem Kollimator leicht ausrechnen, welche Wertepaare hinsichtlich der Beleuchtung an Objektfelddurchmesser und numerischer Apertur durch den Beleuchtungsapparat realisiert werden können. Umgekehrt kann man für bestimmte Werte von Objektfeldgröße und numerischer Apertur, die z. B. durch die Eigenschaften des Projektionssystems bestimmt sein können, bei gegebenem Kollimator die mindest erforderliche Lichtquellengröße oder bei gegebener Lichtquelle die mindest erforderliche Kollimatoröffnung berechnen.

Lichtquellen. Als Lichtquellen für die Projektion kommen in erster Linie nur elektrische Bogenlampen in Frage, deren Vorzüge hinsichtlich der Lichtstärke von keiner anderen Lampe auch nur annähernd erreicht werden. Die spezifische Intensität, d. h. die Leuchtkraft pro Flächeneinheit, ist bei Benutzung der vorgeschriebenen Kohlenstärken für die einzelnen Lampen verschiedener Stromstärke merklich gleich. Dagegen wächst die Größe der Leuchtfläche mit dem Zahlenwert der Ampèrebelastung. Es sollte, namentlich für die Mikroprojektion, nur Gleichstrom angewendet werden, andernfalls ist die Einschaltung eines Gleichrichters oder Umformers dringend zu empfehlen. Die für die einzelnen Lampen vermerkte Mindestspannung darf nicht unterschritten werden, da sonst das Brennen unruhig und ungleichmäßig erfolgt. Die zweckmäßige Wahl der Stromstärke wird bei den einzelnen Projektionsarten behandelt werden.

Neuerdings ist die nutzbare Helligkeit der Bogenlampen durch Verwendung von Dochkohlen mit Kupfermantel (Görz) wesentlich erhöht worden. Diese Spezialkohlen liefern bei höheren Stromstärken eine wesentlich gesteigerte spezifische Intensität des Kraters. Dabei nähert sich die spektrale Zusammensetzung des emittierten Lichtes durch Verschiebung der maximalen Emission nach dem mehr kurzwelligen Teil des sichtbaren Spektrums in höherem Maße dem Sonnenlicht, als dies für Bogenlampen mit gewöhnlichen Kohlen der Fall ist. Für Lampen mit einer kleineren Stromstärke als etwa 15 Ampère ist es noch nicht gelungen, die Vorteile dieser Spezialkohlen in gleicher Weise nutzbar zu machen.

In neuerer Zeit werden für Projektionszwecke auch vielfach hochkerzige Glühfadenlampen benutzt. Solche Lampen sind zwar für die Diapositivprojektion und bei sehr hoher Kerzenstärke auch noch für episkopische Projektion und bescheidenere Ansprüche hinsichtlich der Bildhelligkeit verwendbar; für die Mikroprojektion jedoch sind solche Lampen unzulänglich. Bei der Mikroprojektion spielt nämlich die Größe der Leuchtfläche eine nur untergeordnete Rolle gegenüber ihrer spezifischen Intensität, während hingegen bei der Diapositiv- und episkopischen Projektion eine geringere spezifische Intensität der Lichtquelle bis zu gewissem Grade durch Vergrößerung der Leuchtfläche ausge-

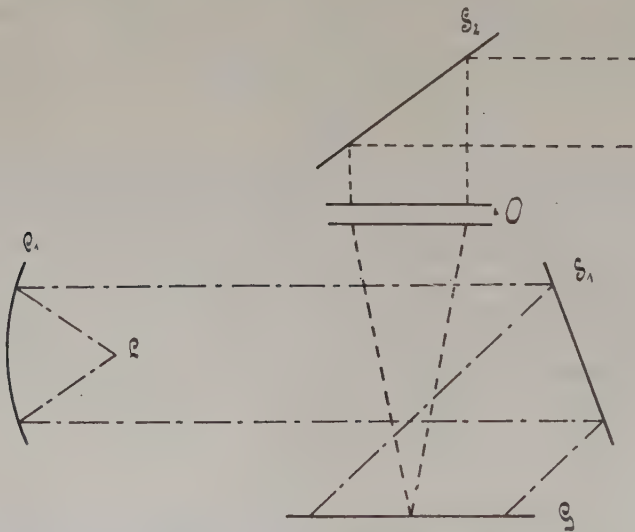
glichen werden kann. Diese Folgerungen lassen sich leicht aus der unter (2) mitgeteilten Beziehung ableiten.

Wesentlich Besseres als solche Glühbirnen leisten für Mikrozwecke die neuen sog. Bogenglühlampen. Bei ihnen wird durch kurzes Vor-glühen eines dünnen Drahtes eine Ionisierung des Lampengases erzeugt, die ihrerseits die Bildung eines schwachen Glühbogens zwischen Anode und Kathode zustande kommen läßt, wodurch schließlich eine Wolframkugel zu heller Weißglut erhitzt wird. Die spezifische Helligkeit dieser Lampe ist etwa fünfmal so groß als die einer Halbwattlampe, steht aber hinter der der Bogenlampe noch beträchtlich zurück. Immerhin leistet diese vollkommen ruhig brennende Lampe für Mikroprojektion auf kurze Entfernungen schon wesentlich mehr als hochkerzige Glühfadenlampen.

1. Episkopische Projektion.

Das Beleuchtungsschema ist in Fig. 85 dargestellt. Die Objektfläche G wird durch Einschaltung des Spiegels S_1 mittels der aus dem Kollimator C_1 austretenden Strahlen beleuchtet. Ein Teil der von der rauhen Objekt-

Fig. 85.



Beleuchtungsschema für episkopische Projektion.

L = Lichtquelle, C_1 = Kollimator, S_1 = Beleuchtungsspiegel, G = Objektfeld, O = Projektionsobjektiv, S_2 = Spiegel.

fläche diffus reflektierten Strahlung wird von dem Projektionsobjektiv O aufgenommen und dem Bilde zugeführt. Die Wahl der passenden Brennweite des Projektionsobjektivs richtet sich nach der gewünschten Vergrößerung und der Projektionsweite. Es gilt die Beziehung:

$$(3) \text{ Brennweite} = \frac{\text{Projektionsweite}}{\text{Vergrößerung}}$$

Diese Formel gilt nur dann genau, wenn man die Projektionsweite von dem schirmseitigen Brennpunkt des Projektionssystems ab mißt. Mißt man die Projektionsweite, wie zumeist üblich, von der Mitte des Projektionssystems aus, so gilt, jedoch nur annähernd, die Beziehung:

$$(3\ a) \text{ Brennweite} = \frac{\text{Projektionsweite}}{\text{Vergrößerung} + 1}$$

Die Helligkeit des episkopisch projizierten Bildes ist zunächst proportional zur spezifischen Intensität der Lichtquelle und zum Quadrate der Lichtquellengröße. Daher kommen in Anbetracht der großen Lichtverluste bei der Reflexion an den opaken Objekten in erster Linie Bogenlampen hoher Stromstärke in Frage. Man benutzt 20—25-Ampèrelampen oder noch stärkere für sehr lichtstarke Projektionen auch zwei nebeneinandergesetzte Lampen. Die Helligkeit des Bildes wächst ferner mit dem Quadrate der Kollimatorapertur. Die Gefahr, welche in der Benutzung großer, dicker Linsenkollimatoren von kurzer Brennweite infolge zu starker Erhitzung durch die Lampe besteht, umgeht man durch die Verwendung von Reflektoren. Als Projektionsobjektive sind ebenfalls nur lichtstarke Systeme zu verwenden; denn bei der episkopischen Projektion ist die Bildhelligkeit auch dem Quadrate der relativen Öffnung des Projektionssystems proportional. Infolge der hohen Öffnung wie auch mit Hinsicht auf die Größe des scharf auszuzeichnenden Objektfeldes, das bis zu 20 cm und darüber im Durchmesser benötigt wird, müssen diese Systeme außer sphärischer und chromatischer Korrektur eine hochgradige anastigmatische Bildfeldebnung besitzen. Von den bedeutenden optischen Firmen werden solche Systeme mit der hohen relativen Öffnung von 1:5 bis 1:4 hergestellt. Die Bildhelligkeit ist ferner umgekehrt proportional zum Quadrate der Vergrößerung, also bei gegebener Projektionsweite umgekehrt proportional zum Quadrate der Brennweite des Projektionssystems.

Zur Projektion eignen sich vornehmlich opake Objekte von geringer Tiefenausdehnung.

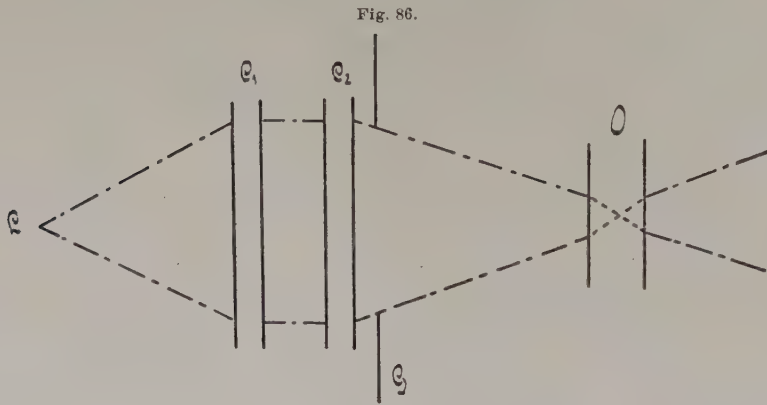
2. Diaskopische Projektion.

Während bei der episkopischen Projektion die Abbildung des Objektes lediglich durch die an seinen opaken Teilen diffus reflektierten Strahlen vermittelt wird, kommen bei diaskopischer Projektion die durch diffuse Reflexion und Beugung im Objekt abgelenkten Strahlen nicht in Betracht im Vergleich zur Intensität derjenigen Strahlen, die das Objekt ohne Ablenkung durchsetzen. Die diaskopische Abbildung beruht daher im wesentlichen auf verschiedener Absorption der Lichtstrahlen im Objekt. Die Beleuchtungsanordnung ist so einzurichten, daß die Lichtquelle in der Aperturblende des Projektionsobjektivs abgebildet wird. Nur dann ist das gesamte Objektfeld auch bei Benutzung von Lichtquellen mit ausgesprochener Flächenstruktur gleichmäßig erleuchtet.

a) Makroprojektion.

Das Schema des Strahlenganges bei der diaskopischen Projektion großer Objektfelder ist in Fig. 86 dargestellt. Die Abbildung der Lichtquelle in der Aperturblende des Projektionsobjektivs erfolgt unter Zuhilfenahme eines Kollektors C_2 . Statt des Glaskollimators C_1 kann auch ein Hohlspiegelkollimator benutzt werden. Die Wahl der geeigneten Brennweite des Projektionsobjektivs richtet sich wie bei der episkopischen Projektion gemäß Formel (3) bzw. (3 a) nach Projektionsweite und erwünschter Vergrößerung.

Als Objekte kommen vornehmlich Diapositive in Frage. Doch wird diese Projektionsart mit Vorteil auch zur Darstellung durchscheinender natürlicher Objekte aus dem Pflanzen- und Tierreich angewendet, z. B. zur Demonstration von Lebensvorgängen an größeren, zumeist in



Beleuchtungsschema für Makroprojektion.

L = Lichtquelle, C_1 = Kollimator, C_2 = Kollektor, O = Objektfeld, O = Projektionsobjektiv.

Küvetten untergebrachten Objekten. Die Bildumkehrung, die bei der Projektion solcher natürlicher Objekte mitunter stört, kann durch Einschaltung eines Umkehrprismas oder Umkehrspiegelsystems aufgehoben werden.

Solange man wenig ausgedehnte Lichtquellen benutzt, ist bei der diaskopischen Projektion großer Objektfelder die relative Öffnung des Projektionsobjektivs praktisch belanglos. Beispielsweise wird bei Benutzung eines Kollimators von der Apertur 0,40 für die Projektion eines Diapositivformates von 9×12 cm bei Anwendung einer 30-Ampèrelampe ein Projektionsobjektiv mit einer relativen Öffnung von rund 1:40, bei Anwendung einer 4-Ampèrelampe gar nur ein Projektionsobjektiv mit einer relativen Öffnung von 1:100 benötigt. Daraus folgt, daß an den Korrektionszustand der Systeme für diaskopische Projektion großer Objektfelder bei der Benutzung von Bogenlicht außerordentlich geringe Anforderungen gestellt zu werden brauchen. Ein kostspieliger Anastigmat hoher Öffnung leistet in diesem Falle nicht

wesentlich mehr als ein einfaches achromatisches und verzeichnungs-freies Linsensystem. Wird die Lichtquelle hingegen durch eine Glühbirne gebildet, so wird das Objektiv zufolge der größeren Ausdehnung der Leuchtfläche mit höherer Öffnung beansprucht. Dann tritt auch die Überlegenheit der besseren Korrektion in den Anastigmaten schon merklich zutage.

b) Mikroprojektion.

Grenzen der Leistungsfähigkeit. Es ist aus der Theorie der mikroskopischen Abbildung bekannt, daß die Auflösung feinsten Strukturen unter starker Vergrößerung abhängt von dem Grade, in welchem die an den Strukturelementen abgebeugten Lichtstrahlen von der Öffnung des Mikroskopobjektivs erfaßt werden können. Die relativ sehr geringe Intensität dieser gebeugten Strahlen erfordert es schon bei subjektiver Beobachtung, die diaskopisch wirksamen, d. h. das Objekt direkt durchsetzenden Strahlen durch Schließen der Aperturblende oder durch Senken des Beleuchtungsapparates, durch schiefe Beleuchtung oder gar durch Anwendung der Dunkelfeldmethoden teilweise bzw. ganz auszuschalten, um das durch die abgebeugten Strahlen vermittelte Strukturbild vor Überstrahlung durch die nur diaskopisch wirksamen Strahlen, das sog. falsche Licht, zu schützen. Die Anwendung dieser Methoden ist bei Mikroprojektion aus Gründen der Bildhelligkeit zum Teil ganz unmöglich, mindestens aber auf wenige Ausnahmefälle beschränkt. Da die Helligkeit des Bildes dem Quadrate des Ausdrucks $\frac{\text{num. Apertur}}{\text{Vergrößerung}}$ proportional ist, und da mit abnehmender Helligkeit unser Auge verhältnismäßig rasch die Fähigkeit verliert, im Bilde Form und Farbe zu unterscheiden, so muß in Anbetracht der hohen, bei der Projektion erforderlichen Vergrößerung fast immer die volle Apertur der Objektive mit den intensiven diaskopisch wirksamen (nicht gebeugten) Strahlenbündeln erfüllt sein. Dies geschieht aber auf Kosten der Auflösung, denn die durch die Lichtbeugung vermittelten Strukturbilder werden dann gänzlich überstrahlt. Die Grenzen des Auflösungsvermögens der Mikrooptik sind daher bei der Mikroprojektion wesentlich enger gezogen als bei subjektiver Beobachtung: Die Mikroprojektion liefert hauptsächlich ein auf Absorptionswirkungen und Lichtbrechungsunterschieden beruhendes Abbild des Objekts und darin unterscheidet sie sich in nichts von der Diapositivprojektion. Hiermit erklärt sich die große Brillanz der Projektionsbilder von gefärbten Präparaten einerseits, andererseits aber auch die oft unbefriedigenden Ergebnisse bei der Projektion ungefärbter Objekte unter starker Vergrößerung. Zur Demonstration allerfeinster, bei subjektiver Beobachtung gerade noch wahrnehmbarer Einzelheiten gibt es nur einen Weg: Herstellung einer mikrophoto-graphischen Aufnahme und Diapositivprojektion. Trotzdem bleibt der Anwendungsbereich der Mikroprojektion ein sehr großer, und die

stetig steigende Verbreitung in Unterricht und Forschung gibt davon Zeugnis. Man muß sich aber dessen bewußt werden, daß in gewissen Fällen die Mikroprojektion die Leistungen der subjektiven Beobachtung bzw. der Mikrophotographie nicht erreichen und deshalb auch nicht ersetzen kann.

Größe der Lichtquelle. Bei der Mikroprojektion mit Objektiv und Okular sind für die starken Mikrosysteme die objektiven Sehfelder so gering, daß schon bei Benutzung einer 4-Ampèrelampe und eines Kollimators von der Apertur 0.40 die Leistung des Beleuchtungsapparates zur Erzielung einer gleichförmigen Beleuchtung des Gesichtsfeldes mit einer Apertur, die der des Objektivs mindestens gleichkommt, ausreicht. Die Anwendung von Lampen höherer Stromstärke erzeugt dann keinen Mehrgewinn an Bildhelligkeit. Bei den mittleren und noch mehr bei den schwachen Objektiven bleibt indes bei Benutzung einer 4-Ampèrelampe wegen des relativ großen Sehfeldes dieser Objektive bei gleichmäßiger Erleuchtung die Beleuchtungsapertur unterhalb der Apertur des Objektivs. Die Bildhelligkeit kann daher insbesondere bei dem schwächsten Systeme durch Anwendung einer Bogenlampe mit höherer Stromstärke noch erheblich gesteigert werden. Indes ist mit Hilfe der Beziehung (2) leicht auszurechnen, daß bei einer Kollimatorapertur von 0.40 eine Bogenlampe von etwa 10—15 Ampère für alle Fälle der Vergrößerung mit Mikrosystemen die Grenze der Höchstleistung an Helligkeit erreichen läßt.

Indes hat die Benutzung von Lampen höherer Stromstärke immer gewisse Vorteile vor der Anwendung solcher Lampen, deren Kratergröße theoretisch gerade zur Erzielung maximaler Helligkeit ausreicht. Der Minimalwert der theoretisch berechneten Kratergröße hat nämlich nur dann auch praktische Bedeutung, wenn die Strahlenvereinigung in der Objektebene aplanatisch ist. Bei einem guten Beleuchtungsapparat wird das zwar wenigstens annähernd der Fall sein, doch wird häufig auf den Korrektionszustand der Beleuchtungssysteme nicht immer genügender Wert gelegt. Ferner erfordert eine Lampe von gerade ausreichender minimaler Kratergröße infolge der namentlich bei geringer Netzspannung auftretenden Schwankungen in der Kraterlage während des Brennens eine dauernde Überwachung und Nachzentrierung. Die Anwendung stärkerer Lampen ist deshalb im Gebrauch bequemer, als während der Projektion ihr nicht so viel Beachtung geschenkt zu werden braucht. Schließlich ist gemäß der Beziehung (2) die Leistung von Lampe und Kollimator durch den Beleuchtungsapparat auf die dem jeweiligen Mikrosystem angepaßten Werte von Gesichtsfeld und Apertur zu transformieren. Bei jedem Objektivwechsel müßten daher Änderungen innerhalb der Beleuchtungsanordnung erfolgen. Ist die Lichtquelle aber größer als der gerade ausreichende Minimalwert, so kann die Häufigkeit der Änderungen im Beleuchtungsapparat beim Wechseln der Objektive verringert werden. Die Anwendung von Lampen

höherer Stromstärke ist also in verschiedener Hinsicht bequemer. Allerdings muß man dann verlangen, daß der jeweils im Projektionsbilde nicht zur Geltung gelangende Mehrbetrag an beleuchtetem Objektfeld oder an Beleuchtungsapertur durch passend angeordnete Gesichtsfeld- bzw. Aperturblenden abgeblendet wird, da sonst durch zu starke und unnötige Erwärmung das Präparat Schaden nimmt.

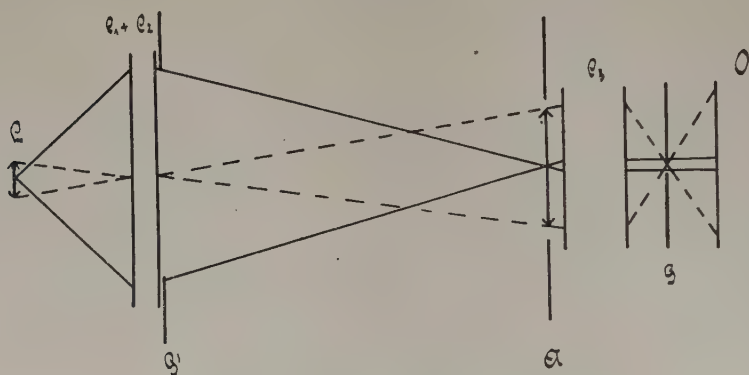
Beleuchtungsanordnung. Wegen der Kleinheit der objektiven Sehfelder reichen Kollimatoren relativ kleiner Dimensionen aus. Man kann daher bei der Mikroprojektion mit Vorteil Kollimatoren aus Hartglas benutzen, bei denen infolge ihrer geringen Dicken und Längsdimensionen auch bei großer Annäherung an die Lichtquelle die Gefahr des Springens nicht in demselben Maße vorliegt, wie bei Glaskollimatoren für die episkopische und die Diapositivprojektion. Die optischen Firmen liefern solche für Mikroprojektion geeigneten Hartglaskollimatoren mit hoher Apertur und erhöhtem sphärischen Korrektionszustand, der entweder durch Kombination zweier Linsenelemente oder durch Anwendung nicht-sphärischer Flächen erreicht wird. Konstruktionen mit größerer Brennweite wird man in Verbindung mit Bogenlampen größerer Stromstärke wegen des größeren Abstandes von der Lichtquelle den Vorzug geben.

Die Umformung der vom Kollimator aufgenommenen Lichtmenge, die durch das Produkt Lichtquellendurchmesser \times Apertur des Kollimators gekennzeichnet werden kann, auf die jeweils notwendigen Werte des Objektfelddurchmessers und der erforderlichen numerischen Apertur im Objektfeld muß durch Wechsel in der Beleuchtungsanordnung bewirkt werden. Das kann auf verschiedene Weise erfolgen. Es ist zweckmäßig, die in Gebrauch befindlichen Beleuchtungsanordnungen nach der Art, wie bei ihnen der Beleuchtungswechsel erzielt wird zu kennzeichnen.

Beleuchtungssystem mit Kollektorwechsel. Dieses System ist zuerst von *A. Köhler* beschrieben worden und wird nach ihm die *Köhlersche* Beleuchtung genannt. Benutzt wird das Mikroskop mit normalem *Abbeschem* Beleuchtungsapparat. Die Irisblende des *Abbeschen* Beleuchtungsapparates wird für das Mikroskop als Aperturblende angesehen und die Lichtquelle durch den Kollektor in dieser Blende abgebildet. Die Größe des Lichtquellenbildes in dieser Blende ist also ein Maß für die Beleuchtungsapertur des Objektfeldes. Bei Benutzung starker Mikrosysteme muß daher entsprechend deren hoher numerischer Apertur das Bild der Lichtquelle in der Irisblende des *Abbeschen* Beleuchtungsapparates groß sein, d. h. der die Lichtquelle abbildende Kollektor muß eine lange Brennweite besitzen und nahe dem Kollimator stehen. Kollimator und Kollektor können in diesem Grenzfall durch eine Linse ersetzt werden (Fig. 87). Geht man zur Benutzung schwächerer Mikrosysteme über, so muß nach (2), um ein größeres beleuchtetes Objektfeld zu erzielen, die Be-

leuchtungsapertur verringert werden. Das erfolgt durch Benutzung eines Kollektors kürzerer Brennweite, der bei geeigneter Annäherung an den Kondensor ein kleineres Abbild der Lichtquelle in der Kon-

Fig. 87.

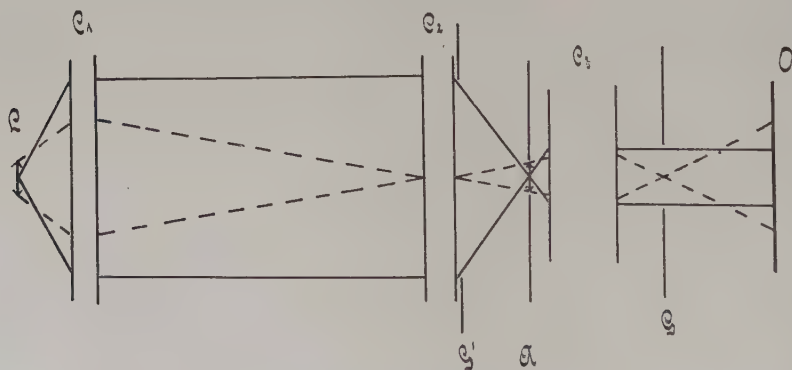


Beleuchtungssystem mit Kollektorwechsel.
Schema für starkes Mikrosystem.

L = Lichtquelle, $C_1 + C_2$ = Kollimator + Kollektor, C_3 = Kondensor, A = Aperturblende des Abbeschen Beleuchtungsapparates, G = Objektfeld, G' = Gesichtsfeldblende, O = Frontlinse des Projektionsobjektivs.
Die Lichtquelle ist in der Kondensor-Irisblende groß abgebildet.
Der Kollektor ist im Objektfeld abgebildet.

densorblende erzeugt. Je schwächer also das Mikrosystem wird, desto kürzer ist die Brennweite des anzuwendenden Kollektors und desto kürzer der Abstand des Kollektors von der Kondensor-Irisblende (Fig. 88). Da der Abstand des Kollektors vom Kondensor noch groß

Fig. 88.



Beleuchtungssystem mit Kollektorwechsel.
Schema für schwaches Mikrosystem.

Bezeichnungen wie in Fig. 87.
Die Lichtquelle ist in der Kondensor-Irisblende klein abgebildet.

genug bleibt gegen die Brennweite des Kondensors, so bildet der Kondensor den Kollektor stets nahezu in der hinteren Kondensorbrennebene, d. h. im Objektfeld ab. Bringt man demnach an den einzelnen

auswechselbaren Kollektoren je eine Irisblende an, so kann diese als Gesichtsfeldblende benutzt werden. Bei Verwendung starker Bogenlampen kann man dann den überschüssigen Betrag der Leistung des Beleuchtungsapparates durch Betätigung der Kollektor- bzw. Kondensor-Irisblende abblenden und das Präparat vor übermäßiger Erhitzung schützen.

Die Voraussetzung des *Köhlerschen* Beleuchtungssystems, daß die Irisblende des *Abbeschen* Beleuchtungsapparates in jedem Falle als Aperturblende für das Mikroskop angesehen werden kann, trifft in Wirklichkeit nur für die stärkeren Objektive zu.

Beleuchtungssystem mit Kollektor- und Kondensorwechsel. Die weniger günstigen Verhältnisse, welche die *Köhlersche* Beleuchtung beim Übergang zu schwachen Systemen aufweist, lassen sich umgehen, wenn man außer dem Kollektorwechsel auch noch einen Kondensorwechsel einführt. Diesen Weg hat *H. Siedentopf* beschritten. Ausgehend von der *Köhlerschen* Beleuchtung, die für starke Mikrosysteme unverändert (Fig. 87) gelassen wird, erfolgt die Beleuchtung für mittlere Systeme, indem von einem dreilinsigen aplanatischen Kondensor die Duplexfront abgeschraubt und das übrigbleibende, ebenfalls aplanatische Linsenteil allein als Kondensor benutzt wird. Für schwache Mikrosysteme wird außerdem noch ein Kollektor kürzerer Brennweite hinzugenommen, der durch den einlinsigen Kondensor im Objektfeld abgebildet wird. Auf diese Weise werden die Beleuchtungsverhältnisse dem verschiedenen Konstruktionstyp der Mikroobjektive besser angepaßt, wenn auch auf Kosten der Einfachheit in der Handhabung des Beleuchtungssystems, da sowohl an der Kollektor- wie auch Kondensoranordnung Wechsel vorzunehmen sind.

Köhler-Siedentopfsche Beleuchtungsanordnung, bei der also stets die Grundsätze angestrebt wird:

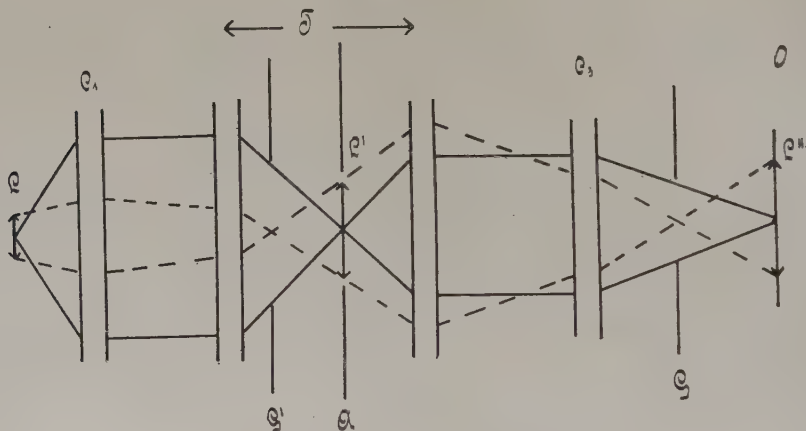
Abbildung des Kollektors im Objekt;

Abbildung der Lichtquelle in der Aperturblende des Projektionsystems, ist im Interesse einer gleichförmigen und möglichst ausgiebigen Beleuchtung unbedingt erforderlich, wenn das Produkt aus Lichtquellengröße und Kollimatorapertur kleiner oder gleich ist dem Produkt aus Objektfelddurchmesser und numerischer Apertur des Mikroskopobjektives. Wie aber schon erwähnt, kann bei Benutzung von Bogenlampen in Verbindung mit einem Kollimator hoher Apertur die mögliche Leistung des Beleuchtungsapparates für stärkere Objektive niemals ausgenutzt werden, und bei Benutzung von Bogenlampen hoher Stromstärke, wie sie in den Projektionsapparaten schon in Hinblick auf die episkopische Projektion zur Anwendung kommen, ist auch für die mittleren und schwächeren Mikroskopobjektive das genannte Produkt im Beleuchtungsapparat noch größer als der für das Objektfeld erforderliche Betrag. Daher kann in den Projektionsapparaten, die mit Lampen hoher Stromstärke ausgerüstet sind, unbedenklich im Interesse ein-

facherer Handhabung von dem *Köhler-Siedentopfschen* Beleuchtungsprinzip abgewichen werden. Gleichgültig, welche Ebene des Strahlenganges im Objektfeld zur Abbildung gelangt, es ist das Projektionsbild immer dann gleichmäßig erleuchtet, wenn nur die Lichtquelle stets genau in der Eintrittspupille des Mikroskopobjektives abgebildet wird. Es bedarf also in solchen Fällen keines Kollektorwechsels, sondern es genügt dann ein

Beleuchtungssystem mit alleinigem Kondensorwechsel. Ein solches wird in den Projektionsapparaten der optischen Werke *E. Leitz* in Verbindung mit Bogenlampen von

Fig. 89.



Beleuchtungssystem mit Kondensorwechsel.

Schema für Mikrosystem mit Eintrittspupille in B'' .

L = Lichtquelle, C_1 = Kollimator, T = Teleskopisches System, C_2 = Kondensor, O = Objektiv,

A = Aperturblinse, G = Gesichtsfeldlinse, G' = Objektfeld.

Die Lichtquelle ist in L' und L'' abgebildet.

Die im teleskopischen System befindliche Irislinse wirkt je nach ihrer Stellung in G' als Gesichtsfeldlinse, in A als Aperturblinse.

20 und mehr Ampère Stromstärke benutzt. Wesentlich bei diesem Beleuchtungssystem ist das zwischen Kollimator und Kondensor eingeschaltete System T (Fig. 89). Es enthält eine Irislinse, die je nach ihrer Stellung als Gesichtsfeld- oder Aperturblinse benutzt werden kann. Das System T kann kurz als „teleskopisches“ bezeichnet werden, obwohl seine Verwendungsart nicht streng diesem Begriff entspricht. Immerhin dürfen die Abstände zwischen Kollimator, teleskopischem System und Kondensor innerhalb weiter Grenzen geändert werden, ohne daß ein nachteiliger Einfluß für die Beleuchtung merklich wird. Es können daher bei der Aufstellung vom Benutzer Fehler nicht begangen werden. Der durch einen Objektivwechsel veränderten Lage und Größe der Eintrittspupille des Objektives wird durch entsprechenden Kondensorwechsel Rechnung getragen. In Fig. 89 ist das Beleuchtungsschema für die Projektion mit einem Mikroobjektiv dargestellt,

bei dem die Eintrittspupille durch die Fassung der Frontlinse des Objektivs gebildet wird.

Das Projektionssystem besteht bei der Mikroprojektion entweder aus der Kombination Objektiv + Okular oder aus alleinigem Objektiv.

Die Vergrößerung bei der Projektion mit Objektiv und Okular ist das Produkt der beiden Teilvergrößerungen von Objektiv und Okular. Es ist: Vergrößerung = Teilvergrößerung des Objektivs \times Teilvergrößerung des Okulars

$$= \frac{\text{Optische Tubuslänge}}{\text{Objektivbrennweite}} \times \frac{\text{Projektionsweite}}{\text{Okularbrennweite}}$$

Die optische Tubuslänge schwankt stark mit dem Objektivtyp und hängt von der Lage des hinteren Objektivbrennpunktes und dem angewendeten Tubusauszug ab. Sie darf nicht verwechselt werden mit der mechanischen Tubuslänge, deren Betrag an der Teilung des Tubusauszuges abgelesen werden kann und die für die Objektive derselben Firma stets auf denselben konstanten Wert eingestellt werden soll. Angaben über die jeweilig wirksame optische Tubuslänge enthalten die Kataloge in der Regel nicht. Die Verzeichnisse der optischen Werke *E. Leitz* geben direkt die aus optischer Tubuslänge und Objektivbrennweite berechnete Teilvergrößerung des Objektivs. Die Verzeichnisse der anderen deutschen Firmen geben die sog. Lupenvergrößerung der Objektive, deren Wert aber im zusammengesetzten Mikroskop für richtige Berechnung der Teilvergrößerungen nicht in Frage kommt. Neuerdings hat sich auch *C. Zeiß* der Berechnungsweise von *E. Leitz* angeschlossen.

Bei der Projektion mit alleinigem Objektiv ist hingegen die Vergrößerung = $\frac{\text{Projektionsweite}}{\text{Objektivbrennweite}}$.

Dieser Wert ist dann der sog. Lupenvergrößerung des Objektivs $\left(\frac{250}{\text{Brennweite}} \right)$ proportional.

Auswahl der Objektive und Okulare. Bei der Mikroprojektion pflegt man nicht eine so große Auswahl von Okularen zu verwenden, wie bei der subjektiven Beobachtung. Man begnügt sich vielfach mit ein oder zwei Okularen. Kombiniert man nun dasselbe Okular der Reihe nach mit verschiedenen Objektiven, so wird auch bei jeweils günstigster Anordnung des Beleuchtungsapparates die Bildhelligkeit von der besonderen Art des Objektivs abhängig, u. zw. ist dann die Bild-

helligkeit proportional zu dem Quadrate von $\frac{\text{numerische Apertur}}{\text{Teilvergrößerung des Objektivs}}$.

Dieser Wert ist aber für die einzelnen Objektive erheblich verschieden, und es ist daher angebracht, im Interesse großer Bildhelligkeit die für die Projektion zu benutzenden Systeme auch mit Rücksicht auf diesen charakteristischen Wert auszuwählen. Wir übersehen, daß im Hinblick auf Helligkeit solche Objektive für die Projektion besonders vorteilhaft erscheinen, die im Verhältnis zu ihrer Teilvergrößerung eine hohe

Apertur besitzen. Bei der Projektion ohne Okular treten ähnliche Verhältnisse auf. Nur ist hier die Bildhelligkeit proportional zu dem Quadrate von $\frac{\text{numerische Apertur}}{\text{Lupenvergrößerung}}$.

Ein Beispiel möge diese Verhältnisse erläutern. Wir betrachten die beiden Systeme:

Systeme	Apertur	Teilvergrößerung	Lupenvergrößerung	Relative Helligkeit mit Okular	Helligkeit ohne Okular
Fluoritsystem 8. .	0·87	69·1	96·2	1	1
Ölimmersion $\frac{1}{10}$.	1·30	70·0	89·3	2·1	2·6

Trotz nahezu gleicher Vergrößerungen besitzen die beiden Systeme sehr verschiedene numerische Aperturen. Das vom System $\frac{1}{10}$ gelieferte Bild ist bei Benutzung desselben Okulars 2·1mal so hell und ohne Okular sogar 2·6mal so hell als das Bild, welches man mit dem Objektiv 8 erhalten würde. Auch unter den schwächeren Systemen lassen sich analoge Verhältnisse, wenn auch nicht so stark ausgeprägt, finden. So sind im allgemeinen die Apochromate lichtstärker als die Achromate entsprechender Vergrößerung. Die erhöhte Farbkorrektion der Apochromate ist für die Projektion im Gegensatz zur subjektiven Beobachtung und zur Mikrophotographie kaum von Bedeutung.

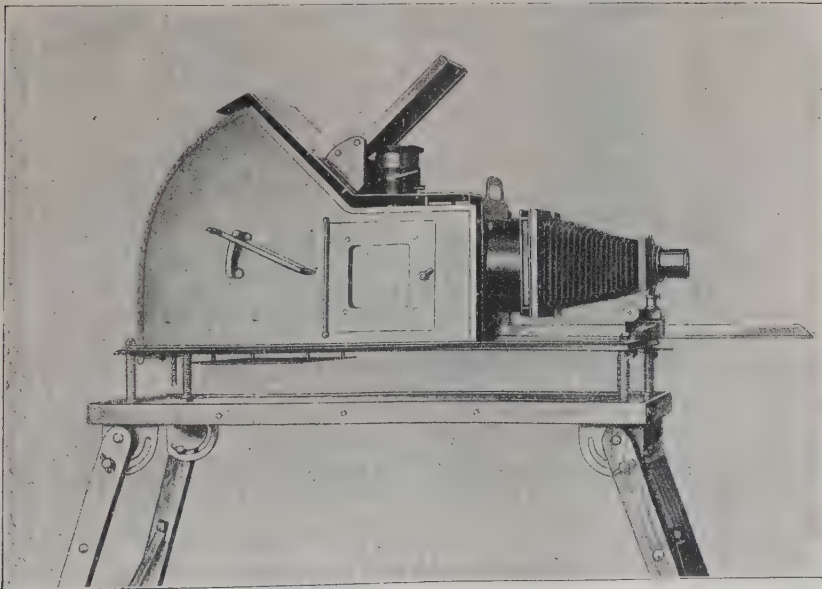
Um die Objektive und Okulare bei der Projektion unter gleichen Bedingungen zu benutzen, für die sie berechnet sind, ist es empfehlenswert, die von der subjektiven Beobachtung abweichende Lage des Bildes nicht durch Tubusverschiebung, sondern durch Anwendung von Projektionsokularen zu bewirken. Diese besitzen eine verschiebbare Augenlinse, die auf die der Projektionsweite entsprechende Marke eingestellt werden soll.

Kühlvorrichtungen.

Zur Absorption der Wärmestrahlen ist für die episkopische und für die Diapositivprojektion eine mit destilliertem Wasser gefüllte Kuvette von 10—15 cm Dicke auch für starke Bogenlampen ausreichend. Bei der Mikroprojektion, wo die Lampenenergie auf eine sehr kleine Fläche im Präparat zusammengedrängt wird, sind indes besondere Vorsichtsmaßregeln anzuwenden, wenn das Präparat vor Schädigung durch Erwärmung bewahrt werden soll. Zusatz von Alaun zu dem Wasser der Kühlkuvette, wie dies mitunter benutzt wird, bewirkt in Wirklichkeit keine wesentlich bessere Absorption der Wärmestrahlen als Wasser allein. Da bei der Mikroprojektion unter Anwendung starker Bogenlampen die für die Projektion nutzbare Kraterfläche wesentlich kleiner ist als die wirkliche Kraterfläche dieser Lampen, so ist das zweckmäßigste Mittel zur Vermeidung überflüssiger Erwärmung des Präparates eine Abblendung aller nicht nutzbaren Strahlen im Beleuch-

tungsapparat. Zu diesem Zwecke müssen, wie wir früher gesehen haben, im Beleuchtungsapparat an zwei Stellen Blenden verfügbar sein, eine Gesichtsfeld- und eine Aperturblende. Die Blenden sind jedesmal gerade so weit zu schließen, daß im Projektionsbild ein Einfluß auf Bildhelligkeit und Bildgröße gerade nicht wahrnehmbar wird. Die Schädigung der Präparate durch zu starke Erhitzung ist in weitaus der überwiegenden Mehrzahl aller Fälle auf nicht genügend sorgsame Befolgung obiger Regel zurückzuführen. An ungefärbten Präparaten können bei richtiger Handhabung dieser Blenden auch mit starken Bogenlampen ohne Schädigung des Präparates Dauerprojektionen ausgeführt werden. Lediglich intensiv blau gefärbte Präparate werden dann noch eine besondere Vorsicht bei Dauerprojektionen erfordern, da solche Objekte die Wärmestrahlen ganz besonders stark absorbieren. Für solche Ausnahmefälle sei empfohlen die Anwendung folgender Lösung, die in einer Küvette von etwa 10 mm Schichtdicke auf einem Reiter innerhalb des Beleuchtungsapparates in den Strahlengang eingeschaltet wird: Man löst in 10 Gewichtsteilen Wasser 1 Gewichtsteil Kupfernitrat und setzt 0.0003 bis 0.0004 Gewichtsteile Gentianaviolett hinzu. Die Lösung ist in der angegebenen Schichtdicke schwach bläulich, was bei der Projektion intensiv blau gefärbter Präparate nicht weiter stört und besitzt ein ausreichend starkes Absorptionsvermögen für Wärmestrahlen. Die Notwendigkeit einer richtigen Handhabung der Blenden wird durch die Anwendung dieser Lösung nicht umgangen.

Fig. 90.

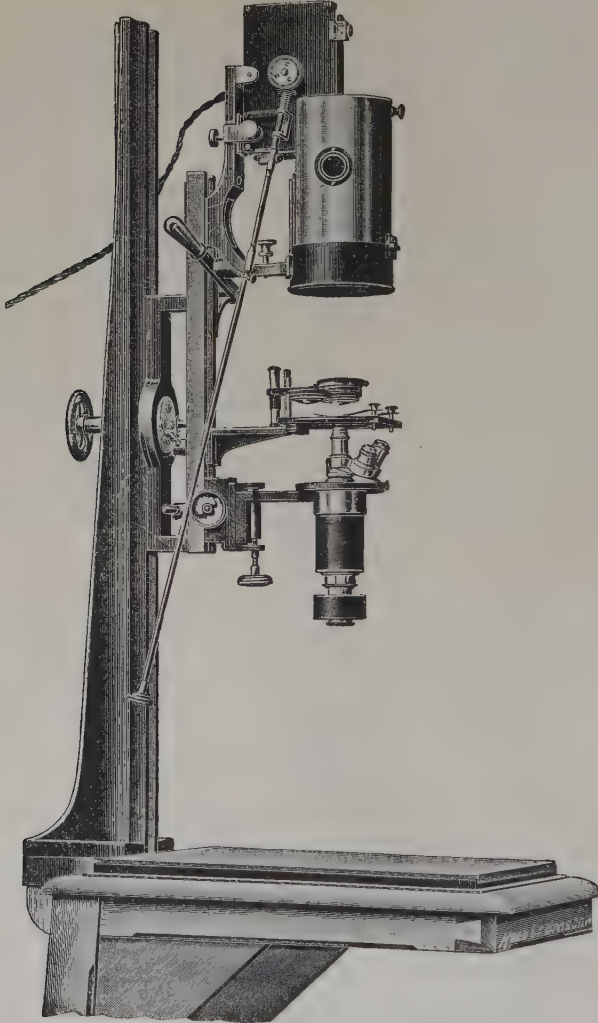


Einfacher Universalprojektionsapparat.

Der Projektionsschirm.

Die Wahl des zweckmäßigsten Projektionsschirmes richtet sich ganz nach der Aufstellung des Projektionsapparates und nach den

Fig. 91.



Kleiner Projektionsapparat nach *Edinger*.

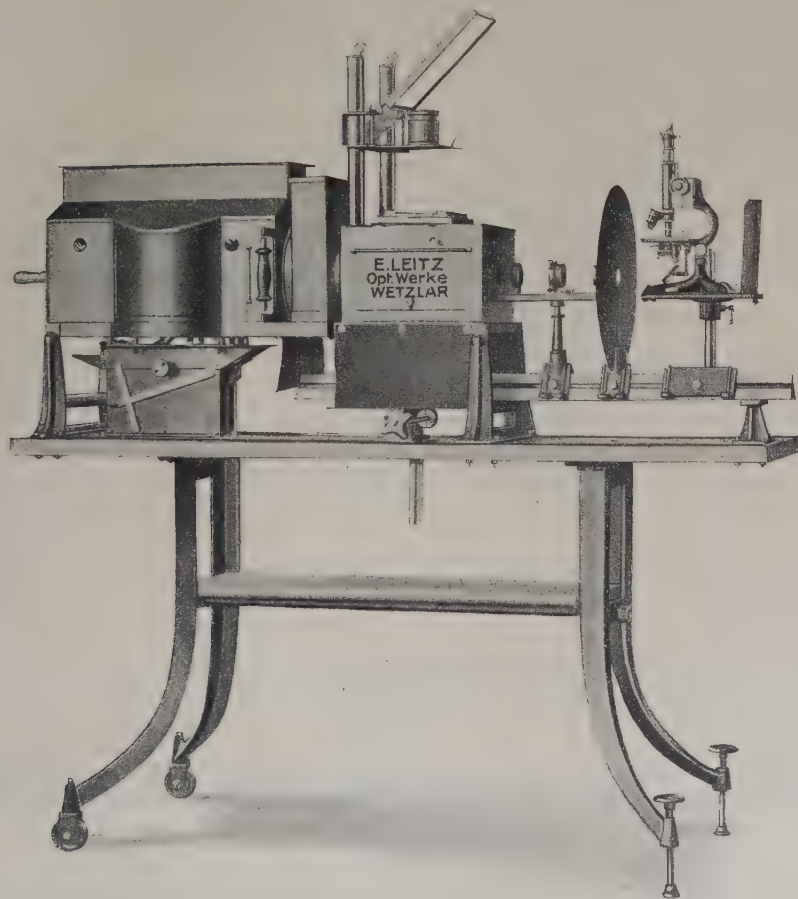
Mikroprojektion.

In vertikaler Lage ist der Apparat auch als Zeichenapparat und nach Ansetzen einer Kamera auch für mikrophotographische Zwecke benutzbar.

räumlichen Dimensionen des Projektionsraumes. Ist der Apparat im Projektionsraum auf Seiten der Zuschauer aufgestellt, so ist für breitgebaute Säle die Benutzung einer Gipswand am geeignetsten. Für mehr

tiefe als breite Säle sind Metallschirme wegen ihres hohen Reflexionsvermögens und der dadurch bedingten besseren Wiedergabe der Helligkeits- und Farbabstufungen mitunter vorzuziehen. In neuerer Zeit machen sich Bestrebungen geltend, den Projektionsapparat gänzlich

Fig. 92.



Universalprojektionsapparat für episkopische, Diapositiv- und Mikroprojektion.

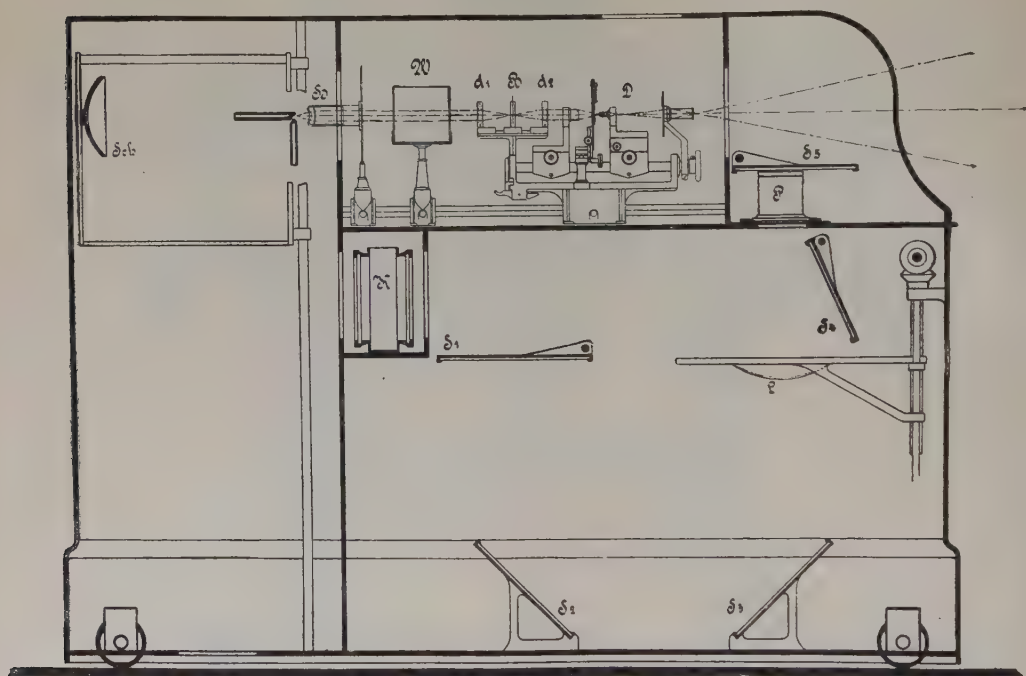
aus dem Zuschauerraum zu entfernen und auf durchscheinende Schirme zu projizieren. Die Benutzung von Mattscheibenglas für solche Schirme ist nicht empfehlenswert. Sehr gute Dienste leisten hingegen mit Paraffin getränkte Schirtingschirme, die sowohl dem Zuschauerkreis ein gutes helles Bild unter ausreichend großem Streuungswinkel vermitteln, wie auch dem Projizierenden auf der Rückseite der Wand ein deutliches Bild von genügender Helligkeit zur Mitbeobachtung und Einstellung darbieten. Bei der episkopischen Projektion von Schriftproben muß bei

Anwendung solcher durchscheinender Schirme die Spiegelverkehrtheit der Bilder durch Einschaltung eines Umkehrspiegelsystems behoben werden.

Projektionsapparate.

Die zweckmäßige mechanische Einrichtung eines Projektionsapparates richtet sich im wesentlichen nach den Aufgaben, denen der Apparat vornehmlich dienen soll. Da in dieser Hinsicht besondere Ver-

Fig. 98.



Großer Universalprojektionsapparat für episkopische, Diapositiv- und Mikroprojektion.

hältnisse des Vortragsraumes sowie Spezialanforderungen seitens des Benutzers eine große Rolle spielen, so würde hier die Mitteilung gewisser Normen unangebracht erscheinen. Die in den Fig. 89—93 dargestellten Apparate sollen daher vielmehr einen Eindruck von der äußeren Form solcher Einrichtungen geben, als Kenntnisse von Einzelheiten vermitteln, über die man sich in den Katalogen der optischen Werke besser unterrichtet.

Als empfehlenswerte Literatur zur näheren Orientierung über die grundlegenden Begriffe auf dem Gebiete der optischen Abbildungslehre und speziell über die für die Projektion in Betracht kommenden Fragen seien angeführt:

Literatur: *S. Czapski*, Theorie der optischen Instrumente nach *Abbe*. Breslau 1893 (E. Trewendt), vornehmlich Abschnitt VII u. VIII. — *A. Gleichen*, Lehrbuch der geometrischen Optik. Leipzig und Berlin 1902 (B. G. Teubner), vornehmlich Kap. XV u. XVIII. — *A. Köhler*, Ein lichtstarkes Sammellinsensystem für Mikroprojektion. *Zt. f. wiss. Mikrosk.* 1902, XIX, S. 417—424. — *O. Lummer*, Grundlagen, Ziele und Grenzen der Leuchttechnik. München und Berlin 1918 (R. Oldenbourg). — *M. v. Rohr*, Die Bilderzeugung in optischen Instrumenten. Berlin 1904 (J. Springer), vornehmlich Kap. IV, IX u. X. — *W. Scheffer*, Wirkungsweise und Gebrauch des Mikroskops. Leipzig und Berlin 1911 (B. G. Teubner). Abschnitt: Die Objektbeleuchtung für Mikrophotographie und Projektion. S. 90—100. — Technische Fragen finden sich behandelt in: *G. Gehlhoff*, Über Bogenlampen mit erhöhter Flächenhelligkeit. *Zt. f. techn. Physik* 1920, I, S. 7—16 u. 37—47. — *C. Jakobj*, Anschauungsunterricht und Projektion. *Zt. f. wiss. Mikrosk.* 1919, XXXVI, S. 273—314 (vgl. auch Mitteilungen der Leitz-Werke, Nr. 16). — *P. E. Liesegang*, Die Projektionskunst (Ed. Liesegangs Verlag, M. Eger, Leipzig). — *W. Pfeffer*, Die Anwendung des Projektionsapparates zur Demonstration von Lebensvorgängen. *Jahrb. f. wiss. Botanik* 1902, XXXV, Heft 4, S. 711—745. — Eine Bogenglühlampe (Referat nach amerikanisch-englischen Patentschriften). *Zt. f. phys. Unterricht* 1921, XXXIV, S. 37.

Die Untersuchung des ungefärbten Objektes. Hohler Objektträger, heizbarer Objektisch, Tuschepräparat und Dunkelfeldbeleuchtung.

Von Dr. med. u. phil. **Bruno Busson**, Wien.

Mit 10 Textabbildungen.

Das Studium der Kleinlebewesen erfordert es, diese in lebendem Zustande unter dem Mikroskope zu betrachten, weil man nur auf diese Weise Aufschluß über gewisse vitale Eigenschaften, über Bewegung, Farbstoffbildung, Stoffwechsel- und andere Lebensvorgänge erhalten kann, die an der toten, wenn auch gefärbten Zelle gar nicht mehr oder nicht mit der gleichen Deutlichkeit beobachtet werden können. Auch für die Diagnostik und Differentialdiagnostik ist die Untersuchung der lebenden Zellen sowohl in der Bakteriologie als auch in der Protistenkunde ein nicht zu unterschätzender Behelf, der manchmal sogar von ausschlaggebender Bedeutung sein kann. Gewisse Protozoen, z. B. die Amöben, lassen sich nur schwer oder unter beträchtlicher Schädigung ihres Protoplasmas und seiner so äußerst feinen Struktur in entsprechender Weise konservieren und färben, wogegen die lebende Zelle das aufmerksam beobachtende Auge selbst äußerst feine Unterschiede der Zellstruktur erkennen läßt. Damit soll jedoch die Bedeutung dieser Art der Untersuchung gegenüber jener des gefärbten Präparates nicht überschätzend hervorgehoben werden, vielmehr nur betont sein, daß sie unter gewissen Verhältnissen ihre eigene Bedeutung besitzt und durch das Färbeverfahren kaum ersetzt werden kann.

Am häufigsten wird die Untersuchung des ungefärbten Objektes in der Weise vorgenommen, daß man die Mikroorganismen unter möglichst natürlichen Verhältnissen beläßt und sie unter dem Mikroskope direkt in den betreffenden Sekreten oder Exkreten, in Exsudaten, Blut oder in solchen künstlichen Substraten betrachtet, die ihnen, wie gesagt, möglichst natürliche Verhältnisse zur Beibehaltung und Entfaltung ihrer Lebeseneigentümlichkeiten bieten. Derartige zur Beobachtung geeignete flüssige Substrate sind die verschiedenen flüssigen Nährböden, wie etwa Fleischbouillon oder Peptonwasser, ferner die dem Blute isotonische Kochsalzlösung (0.85%ig für Warmblüter, 0.6%ig für Kaltblüter) mit oder ohne weitere Beimengungen wie Blutserum, Ascites, Humor aqueus u. dgl.

Durch geeignetes Experimentieren sind wir in der Lage, neben den wichtigsten Eigentümlichkeiten, welche die lebende Zelle von selbst unserem Auge darbietet, Studien auch darüber anzustellen, wie sich die Lebenstätigkeit der Zellen unter geänderten Lebensbedingungen, die wir durch Zusatz oder Entziehen gewisser Substanzen oder chemischer Reagenzien verbessern oder verschlechtern können, darstellt. Wir können auf diese Weise oftmals die Strukturverhältnisse besser zur Anschauung bringen (Zusatz von Essigsäure), wir können Stoffwechselvorgänge beobachten, diesbezügliche Zellreaktionen durchführen, wir können die Umwandlung der vegetativen Formen in Dauerformen, dann wieder deren Auskeimung veranlassen und beobachten. Auch über gewisse Teilungs- und Fortpflanzungsvorgänge gibt oft nur die Betrachtung der lebenden Zelle einen sicheren Aufschluß. Wir sehen ferner, wie die lebenden Bakterien unter dem Einfluß gewisser Immunsera zusammengeballt, verändert oder aufgelöst werden, wir können die Wirkung gewisser, von den Zellen selbst ausgeschiedener Fermente studieren (Hämolyse, Plasmolyse, Plasmoptyse, Pyocyanase und sonstige Fermentwirkungen, Opsoninwirkungen u. s. w.).

Aus diesen Beispielen ist ohneweiters die reiche Mannigfaltigkeit zu erkennen, die uns das Studium des ungefärbten Objektes im lebenden Zustande bietet. Aber selbst die Betrachtung der ungefärbten, wenn auch toten und fixierten Zelle bietet manchmal Vorteile gegenüber den Färbemethoden, weil unter Verwendung einer bestimmten Technik (z. B. Tuscheverfahren) sich die Konturen der Zellen schärfer und deutlicher im optischen Bilde darstellen lassen als durch die Färbungsmethoden. Wir differenzieren beispielsweise die *Spirochaeta pallida* von der *Sp. refringens* oder *Sp. dentium* vorwiegend nach ihrem morphologischen Aussehen, nach der Art der Windungen, kurz nach der Kontur, die am besten im ungefärbten Objekte, ganz besonders im Tuschepräparate oder unter Benutzung der Dunkelfeldbeleuchtung sichtbar gemacht wird.

Da für die Betrachtung des ungefärbten Objektes eine ganz bestimmte Handhabung der dem Mikroskop beigegebenen optischen Hilfsapparate notwendig ist, die auch erheblich von jener abweicht, wie sie für die Darstellung gefärbter Präparate nötig ist, so möge hier folgendes ganz kurze Erwähnung finden.

Das Farbenbild des gefärbten Objektes entsteht durch Absorption der durch das Objekt gehenden Strahlen, wodurch dann das Farbenbild und die verschiedenen Farben als solche zum Ausdruck kommen. Aus diesem Grunde benutzt man zur Betrachtung des Farbenbildes maximale Beleuchtung unter Zuhilfenahme eines eigenen Kondensors (*Abbe*), der die Lichtstrahlen, u. zw. nicht nur die parallelen, sondern auch die konvergent auffallenden zu einem Strahlenkegel vereinigt, dessen Spitze in das Objekt konzentriert wird. Gleichzeitig bleibt

die unter dem Kondensor befindliche Blendungsvorrichtung offen, wodurch bei „offenem Kondensor“ maximale Beleuchtung geschaffen und die Betrachtung des gefärbten Objektes „im Lichtmeere“ möglich wird, was notwendig erscheint, wenn die einzelnen Farben und Farbtöne deutlich unterschieden sein sollen.

Ganz anders liegen nun die optischen Verhältnisse bei der Entstehung des Bildes vom ungefärbten Objekte, das nur ein Strukturbild der Zelle liefert. Dieses Strukturbild kommt nicht durch Absorption, vielmehr durch Diffraktion der durchgehenden Lichtstrahlen zustande. Demnach beruht das Strukturbild der Zellen auf Differenzen im Lichtbrechungsvermögen der einzelnen Zellteilchen und dieses Bild wird umso ausgeprägter sein, je größer die Differenzen im Lichtbrechungsvermögen in einzelnen Teilchen der Zellsubstanz sind. Gleichzeitig werden aber derartige Differenzen im Lichtbrechungsvermögen umso deutlicher sein, je paralleler die Lichtstrahlen durch das Objekt hindurchgehen und sie werden anderseits umso undeutlicher, je mehr diese Lichtstrahlen konvergieren. Aus diesem Grunde muß das ungefärbte Objekt, wenn wir von der Dunkelfeldbeleuchtung absehen, entweder unter Ausschaltung des Abbeschen Beleuchtungsapparates, der ja die parallelen Lichtstrahlen zu einem Lichtkegel im Objekte vereinigt, betrachtet werden, oder man muß das unter dem Apparate befindliche „Diaphragma“, die „Blende“ so eng zusammenschieben, daß alle Randstrahlen abgehalten und nur die durch die Mitte der Linse tretenden, fast parallelen Strahlen in das Objekt gelangen können. Streng genommen sind auch diese Strahlen nicht völlig parallel, aber sie bilden einen so spitzwinkeligen, langgezogenen Strahlenkegel, daß sie in der Wirkung den parallelen Strahlen fast gleichkommen. Eine ähnliche Wirkung erzielt man schließlich noch durch Tieferstellen des Abbeschen Kondensors oder entsprechendes Schließen der Blende.

Würde man das ungefärbte Objekt bei offenem Kondensor, also „im Lichtmeer“ betrachten, dann würden die von den Zellteilchen gebrochenen Lichtstrahlen in dem konvergierenden Lichtkegel stets wieder auf entgegengerichtete Strahlen der anderen Seite treffen und sich gegenseitig auslöschen, wodurch das Strukturbild vernichtet und gar nicht zustande kommen würde. Ist aber die Beleuchtung richtig gewählt, u. zw. je nach der Stärke der zur Verwendung gelangenden Objektive, dann werden im Zellenleibe infolge des verschiedenen Lichtbrechungsvermögens der einzelnen Teilchen, dunklere oder hellere Partien, feine Schatten und Linien sichtbar, die zusammen das jeder Zelle eigene Strukturbild ergeben. Die feinen Schatten und lichter Stellen werden noch deutlicher hervortreten, wenn zu intensives Licht gedämpft wird, was man dadurch erreicht, daß man zwischen Lichtquelle und Objekt eine blaue Glas- oder Mattscheibe, eventuell eine mit ammoniakalischer Kupfersulfatlösung gefüllte, sog. „Schusterkugel“ einschaltet.

Wir verfügen über verschiedene Methoden, die Bakterien und Protozoen in lebendem aber ungefärbtem Zustande zu studieren, und es ergibt sich aus dem Vorstehenden von selbst, daß die Anwendung der einen oder anderen zunächst abhängen wird von der Art der Untersuchung, die wir vornehmen wollen.

Das einfache Deckglas, das Quetsch- oder Zupfpräparat.

Diese Methode findet vornehmlich ihre Anwendung dann, wenn wir Bakterien, Pilze, Protozoen oder Filarien u. s. w. in ungefärbtem Zustande im Gewebe, im Blut, Eiter, Milch, Faeces u. s. w. als sog. „natives Präparat“ betrachten wollen. Es ist ja fast unmöglich, ungefärbte Bakterien in einem Gewebsschnitte als solche aufzufinden, wohl aber gelingt dies, wenn wir das Gewebe in einem flüssigen Medium zerpupfen oder quetschen und unter das Deckglas bringen. Die Beobachtung wird oftmals noch verschärft, wenn wir vom Rande des die Flüssigkeit bedeckenden Deckgläschens Lösungen zufließen lassen, die das Gewebe zur Quellung und Aufhellung bringen (verdünnte Kalilauge), oder wenn wir auf dieselbe Weise verdünnte Essigsäure zufließen lassen, wodurch wiederum Kerne und Kernstrukturen aus dem sie umhüllenden Zellplasma mit größerer Deutlichkeit hervortreten.

Das einfache Deckglaspräparat stellen wir uns in der Weise dar, daß wir auf den gut gereinigten Objektträger z. B. einen nicht zu großen Tropfen Blut bringen und ihn mit einem Deckgläschens zudecken. Das Blut wird sich bei richtiger Wahl der Größe des Tropfens zufolge der Last des Deckgläschens unter diesem in einer gleichmäßigen dünnen Schicht ausbreiten, die es gestattet, neben den auseinandergedrängten Blutkörperchen eventuell vorhandene Parasiten und Bakterien deutlich zu erkennen. So findet man Recurrensspirillen, Spirochäten, Trypanosomen u. s. w. sich deutlich zwischen den Blutzellen bewegen. Allerdings darf der Tropfen nicht zu groß gewählt werden, sonst „schwimmt“ das Deckglas auf dem Tropfen, die Flüssigkeit ist meist in ständiger Bewegung, sie „fließt“ und auch die Schichte selbst ist zu dick geraten. Infolgedessen die einzelnen Elemente sich nicht nebeneinander ausbreiten, sondern übereinander lagern, wodurch die Beobachtung erheblich gestört wird. Wenn der Tropfen zu klein ist, so bilden sich Inseln, der Tropfen verdunstet leichter, und größere Objekte wie Filarien oder Protozoen können eventuell sogar durch die Last des Deckgläschens zerquetscht werden. Manchmal läßt sich der Fehler korrigieren, wenn man am Rande des Deckgläschens mit ausgezupftem Fließpapier etwas Flüssigkeit absaugt oder im gegenteiligen Falle etwas zufließen läßt, was leicht gelingt, da sich die Flüssigkeit zufolge des capillaren Raumes gut unter das Deckglas von selbst einsaugt. Aber diese Möglichkeiten sind abhängig von der Art des zu untersuchenden Materials, und man wird nur zu oft genötigt sein, ein schlechtes Präparat zu erneuern. Ein

richtig gefertigtes Präparat läßt sich ohneweiters sowohl mit dem Trockensystem, als auch mit der Immersion betrachten, in welchem letzterem Falle man nur darauf zu sehen hat, daß man nicht so weit gegen den Rand verschiebt, daß Zedernöl und Untersuchungsmaterial am Rande des Deckgläschens sich mischen.

Übt man beabsichtigterweise einen eventuell sogar über die natürliche Last des Deckgläschens hinausgehenden Druck auf das Objekt aus, so spricht man von einem Quetschpräparat. So werden z. B. Schleimflocken aus Cholera- oder Dysenteriestühlen, die man mit einem Tröpfchen physiologischer Kochsalzlösung oder Peptonwasser unter ein Deckgläschen gebracht hat, durch sanften Druck auf dieses zu flächenhafter Ausbreitung in dünner Schichte und dadurch zur Aufhellung gebracht, und auf ganz dieselbe Weise kann man Aktinomyceskörner im Eiter schön darstellen, wenn man sie in verdünnter Lauge quetscht. Soll der Druck nur vorsichtig oder nicht einmal im vollen Ausmaße der Schwere des Deckgläschens ausgeübt werden, dann hilft man sich in der Weise, daß man die vier Ecken des Deckgläschens mit kleinen Wachströpfchen oder Wachsfüßchen versieht und diese dann, nachdem man das Deckglas aufgelegt hat, unter der darübergehaltenen heißen Platinöse langsam und in gewünschtem Maße zum Schmelzen bringt, was besonders für die Betrachtung größerer Parasiten etwa gewisser Filarien u. s. w. von Wichtigkeit ist.

Das Deckglas- und das Quetschpräparat eignen sich besonders zur Untersuchung von Flüssigkeiten, denen normalerweise corpusculäre Elemente beigemengt sind, weil jede stärkere Eigenbewegung eventueller Parasiten in diesem engen Raume den zunächstliegenden corpusculären Elementen mitgeteilt wird, wodurch diese in zitternde oder schleudernde Bewegung geraten und die Aufmerksamkeit des Beobachters sofort auf die richtige Stelle lenken. Zum Studium und zur Differentialdiagnose der Protozoen ist diese Methode häufig unentbehrlich, weil nur auf diese Weise die Beobachtung der lebenden Zelle ermöglicht wird. So wird z. B. die Differenzierung der Ruhramöben gegen die ungefährliche *Entamoeba coli* wohl vorwiegend im nativen Deckglaspräparate vorgenommen, weil die zur Differenzierung so wichtigen Unterschiede in der Art der Körnung des Protoplasmas, die verschiedene Zahl der Vakuolen, die Ausbildung der Kernmembranen u. s. w. nur im Strukturbilde der lebenden Zelle gut erkannt werden können. Auch Malariaparasiten lassen sich eventuell unter Zusatz von Essigsäure auf diese Weise im nativen Blutpräparate gut darstellen, und das Studium der Dermatomykosen, der parasitären und saprophytischen Pilze erfolgt am besten im „nativen“ Präparate im ungefärbten Objekte.

Ganz besonders aber ist das Deckglaspräparat geeignet für das Studium von Zellreaktionen, weil wir durch vorsichtiges Absaugen der Flüssigkeit auf der einen Seite des Deckgläschens und durch gleichzeitiges Zufließenlassen bestimmter Lösungen von der anderen Seite

jeweils geänderte Medien für die Zellen schaffen können. Der Vorgang dabei ist sehr einfach: Man bringt knapp neben das Deckgläschen auf den Objektträger die betreffende Flüssigkeit, die man zufügen will, und saugt nun mit Fließpapierstückchen allmählich auf der anderen Seite an. Das Absaugen geschieht am besten in Intervallen und mit Fließpapier, das am Rande schon ein wenig befeuchtet war, um ein stürmisches Ansaugen, das alle corpusculären Elemente mitreißen würde, zu verhindern. Dann fügt man eine Pause ein, damit sich die Flüssigkeiten unter dem Deckglase mischen, und saugt nun neuerlich ab, wiederholt dies wenn notwendig so lange, bis eben die gewünschte Verteilung und Durchmischung eingetreten ist. Man kann auf diese Weise beliebige flüssige und dem Medium sich mischende Substanzen nachsaugen, wie Sera, Säuren, Laugen, Jodlösungen u. s. w., und ihre Wirkung und die in den Zellen ausgelösten Reaktionen studieren.

Will man derartige Präparate einige Zeit aufbewahren, dann muß der Rand des Deckgläschens durch Umräumung z. B. mit Damarlack abgedichtet und so vor Verdunstung geschützt werden, oder man gibt das ganze Präparat in eine geschlossene sog. „feuchte Kammer“, in welcher die Luft mit Wasserdampf gesättigt ist, so daß das Präparat selbst nicht verdunsten und dadurch eintrocknen kann. Auch Glycerin-gelatine eignet sich gut für solche Dauerpräparate, der Rand wird ebenfalls mit Damarlack abgeschlossen.

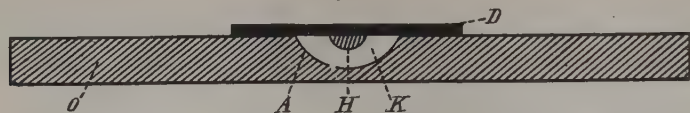
Zur Herstellung der „Zupfpräparate“ werden vornehmlich Gewebstückchen, Membranen u. s. w. mit feinen Nadeln oder Skalpellspitzen in flüssigen Medien zerzupft und unter dem Deckglas gequetscht. Auch bei diesen Präparaten dient die Beigabe von verdünnten Laugen u. s. w. zur besseren Aufhellung, insbesondere weil sich oft die Bakterien, besonders aber die Pilze erheblich resistenter erweisen als die Gewebszellen selbst, die rascher quellen oder zerstört werden.

Der hängende Tropfen.

Die häufigste Anwendung zur Beobachtung lebender, aber ungefärbter Objekte, besonders in der Bakteriologie, findet der sog. „hängende Tropfen“. Zur Herstellung eines derartigen Präparates benötigt man einen hohl geschliffenen Objektträger und ein sauber gereinigtes Deckgläschen. Das Präparat stellt man sich dann in der Weise her, daß man mittels einer Öse oder Capillare auf die Mitte des Deckgläschens einen Tropfen des flüssigen zu untersuchenden Materiales bringt, nachdem man vorher auf dem Objektträger den Rand des Ausschliffes mit einem Pinsel ringsum mit Vaseline umsäumt hat. Dann stülpt man den Objektträger mit dem Hohlsliff nach unten über das plan auf dem Tische liegende, mit dem Tropfen versehene Deckglas, das ohneweiters nach sanftem Druck an der Vaseline kleben bleibt. Der Objektträger wird daraufhin rasch umgekehrt, so daß nunmehr das

Deckgläschen nach oben zu liegen kommt, während der an ihm haftende Tropfen nunmehr frei in das Lumen des Ausschliffes hineinhängt. Man muß von Anfang darauf sehen, daß der Tropfen am Deckgläschen zentral liegt, damit er nicht mit den Wänden des Objektträger-ausschliffes in Berührung kommt, weil er sonst sofort an diesem hinabfließen würde. Weiters muß die durch die Vaselinschichte beabsichtigte Abdichtung vollkommen sein, d. h. es darf zwischen dem Luftraume der auf diese Weise im Objektträger gebildeten Kammer (s. Fig. 94) und der

Fig. 94.



A kalottenförmiger Querschliff im Objektträger O; D Deckgläschen; H hängender Tropfen; K die durch das Deckgläschen abgeschlossene Kammer.

übrigen Außenluft keine Kommunikation bestehen. Sind solche Kommunikationen vorhanden, was man ohneweiters erkennt, wenn man die Oberfläche des Deckgläschens schräg von der Seite betrachtet, weil dann die durch die Vaseline durchgehenden Luftbläschen deutlich spiegeln, dann muß man sie durch leichten Druck, eventuell durch Umranden mit Vaseline und vorsichtiges Hin- und Herschieben des Deckgläschens auspressen, ohne dabei aber den hängenden Tropfen dem Rande des Ausschnittes zu sehr zu nähern.

Ist die Kammer vollkommen dicht, dann sättigt sich ihr Luftraum in kürzester Zeit mit Wasserdampf, der sich auch zum Teile in Form feinsten Tröpfchen an der Innenseite des Deckgläschens und häufig am Boden kondensiert. Dabei bleibt der hängende Tropfen zufolge der Oberflächenverdunstung so lange in Bewegung, bis die Luft dieser kleinen Kammer mit Wasserdampf gesättigt ist und keine Feuchtigkeit mehr aufzunehmen vermag. Dieser Zustand tritt sehr bald ein, wenn die Vaselindichtung gut ist. Ist dagegen der Abschluß unvollkommen, dann findet ein fortwährender Austausch der verschiedenen Feuchtigkeitsgehalte von innen nach außen statt. Die Verdunstung des Tropfens dauert dann weiter, und dieser selbst kann nicht zur Ruhe kommen. Ein solcher Tropfen wird nicht nur rasch kleiner und verdunstet schließlich ganz, er ist auch schwer zu beobachten, weil sein Volumen und seine Grenzen sich ständig ändern. Auch den in ihm suspendierten Teilchen wird die durch die Verdunstung hervorgerufene Bewegung mitgeteilt, was zu falschen Resultaten der Beobachtung führen kann.

Dagegen bleibt der Tropfen, wenn die Abdichtung verläßlich ist, lange Zeit vor dem Verdunsten geschützt und als solcher erhalten.

Für sehr lang dauernde Beobachtungen bedient man sich eines Objektträgers, der in der ausgeschliffenen Mulde überdies noch eine kleine seitliche, ringförmige Rinne besitzt, die mit Wasser beschickt werden kann und die feuchte Kammer sättigt.

Der Tropfen selbst soll nicht zu groß gewählt werden, weil er sonst leicht mit den Rändern oder, wenn er zu tief hängt, auch mit dem Boden des Ausschliffes in Berührung kommt, wodurch das Präparat unbrauchbar wird. Vor allem müssen die Deckgläschen sorgfältig gereinigt, insbesondere fettfrei sein, weil sonst der Tropfen nicht haftet und „zusammenläuft“. Man reinigt die Deckgläser am besten mit verdünnter Salz- oder Schwefelsäure, dann mit Alkohol und Äther und erhitzt darauf die trockenen Gläschen im Bunsenbrenner. Die Stärke der verwendeten Deckgläschen soll nicht über 0.15 mm betragen, weil sie sonst zu dick sind und beim Versuche, unter der Immersion scharf einzustellen, leicht durchgedrückt werden können, was insbesondere bei der Betrachtung von infektiösem Material sehr unangenehm empfunden wird.

Will man an sich nicht flüssiges Material, etwa Bakterienkolonien einer Agar- oder Gelatinekultur im hängenden Tropfen betrachten, so gibt man wie sonst einen Tropfen Wassers, physiologischer Kochsalzlösung, Bouillon oder Peptonwasser auf das Deckgläschen und überträgt nun durch Verreiben in diesen Tropfen mit der Spitze einer Platinnadel ganz wenig von der betreffenden Kultur. Destilliertes Wasser soll hierzu nicht verwendet werden, weil dadurch die osmotischen Verhältnisse in der Bakterienzelle eine Änderung erfahren, was nicht ohne Einfluß auf die Struktur der Zelle selbst bleiben kann; überdies enthält destilliertes Wasser ebenso wie gestandenes Leitungswasser stets viele Keime, wodurch die Beurteilung der Präparate erschwert wird.

Die Betrachtung des hängenden Tropfens unter dem Mikroskope mit Immersion, das sog. Einstellen, geschieht am zweckmäßigsten in der Weise, daß man zuerst den Rand des Tropfens mit schwachen Objektiven aufsucht und zentriert. Erst wenn der Tropfen zentriert ist, verwendet man die Immersion, indem man zunächst den Tubus so lange senkt, bis er in den Öltropfen taucht und nun sucht man durch weiteres vorsichtiges Senken zunächst den Rand des Tropfens einzustellen. Am Rande des Tropfens drängen sich meist die Bakterien zusammen, weil sie hier am besten ihr Sauerstoffbedürfnis befriedigen können, und selbst völlig unbewegliche Keime werden hier infolge der Capillarwirkung angesammelt. Außerdem bleiben hier die Bakterien, auch wenn sie gut beweglich sind, oft durch einige Zeit unbeweglich liegen, sie „stranden“ wie man zu sagen pflegt, und sind so in ruhendem Zustande gut zu beobachten. Will man die Art und Weise ihrer Bewegungen studieren, dann verschiebt man den Objektträger zweckmäßig etwas nach einwärts gegen die Mitte des Tropfens, wo dann in der dichteren Flüssigkeitsschichte des Tropfens die Bewegungen der Bakterienzellen in natürlichem Zustande zu erkennen sind. Allerdings ist es hier viel schwieriger, die einzelnen Formen zu fixieren, weil die dickere Flüssigkeitsschichte den Bakterien Exkursionen nicht nur in der Ebene des Gesichtsfeldes, sondern nach allen Richtungen des Raumes gestattet.

Die Anwendung des „hängenden Tropfens“ dient in der Bakteriologie besonders zur Feststellung, ob Bakterien beweglich oder unbeweglich sind, und ob diese Bewegung eine taumelnde, schlängelnde, schwärmende oder gleitende ist. Im hängenden Tropfen heben sich die Sporen der lebenden Zelle zufolge ihres stärkeren Lichtbrechungsvermögens scharf von dem übrigen Zelleibe ab; auch die Kapseln der Bakterien können bei richtiger Handhabung der Lichtblende als solche erkennbar gemacht werden.

Eine Reihe von physiologischen und biologischen Vorgängen läßt sich im hängenden Tropfen verfolgen und studieren. Insbesondere hat der hängende Tropfen für die mikroskopische Agglutination eine weitgehende Bedeutung erlangt, besonders dann, wenn die Diagnose möglichst rasch und zur Orientierung, oder wenn die Identifizierung einzelner Kolonien, also bei Verfügung nur geringer Bakterienmengen, die zur makroskopischen Agglutination nicht ausreichen, vorgenommen werden soll. Über die Art der Ausführung dieser Reaktion wird in einem besonderen Kapitel ausführlicher berichtet werden, hier soll nur erwähnt sein, daß man die entsprechenden Verdünnungen des Serums in Form eines hängenden Tropfens auf das Deckgläschen bringt und mit einer Platinnadel das Kulturmateriel darin verreibt, bis eine leichte Trübung des Tropfens eingetreten ist. Zur Kontrolle dient ein in derselben Weise aus Peptonwasser, Bouillon oder physiologischer Kochsalzlösung hergestellter hängender Tropfen mit demselben Kulturmateriel. Den schließlichen Ausfall der Agglutination zu diagnostischen Zwecken im hängenden Tropfen betrachtet man nach *Paltauf* stets zuerst unter Anwendung schwacher Vergrößerung, also mit dem Trockenlinsensystem, weil sich auf diese Weise die Bakterieninseln und -häufchen umso deutlicher im Gesichtsfelde abheben.

Auch die *Widalsche* Reaktion mit Patientenserum wird in derselben Weise im hängenden Tropfen durchgeführt, nur sind naturgemäß die Verdünnungen des Serums entsprechend niedriger zu wählen, und es wird gewöhnlich noch außer der üblichen Kontrolle, die nur die Bacillenemulsion enthält, auch noch eine zweite eingefügt, die aus einem Tropfen verdünnten hochwertigen Immunserums + Bakterien besteht.

Handelt es sich schließlich um die Agglutination flüssiger Kulturen im hängenden Tropfen, etwa um Cholerapeptonwasserkulturen, dann wird einfach je ein Tropfen Kultur mittels der Öse der entsprechenden Serumverdünnung zugefügt.

Auch zum Studium der bakteriolytischen Einwirkung gewisser Fermente oder gewisser Immunkörper auf Bakterienzellen, wie etwa die Einwirkung der Pyocyanase oder spezifischer bakteriolytischer Immunsera, ist der hängende Tropfen die beste Methode. Der Ausfall des „*Pfeifferschen* Versuches“, die bei ihm auftretenden spezifischen Veränderungen der Bakterien und Vibrionen, die unter dem Einfluß des Immunserums auftretende Umgestaltung und Auflösung sind am besten

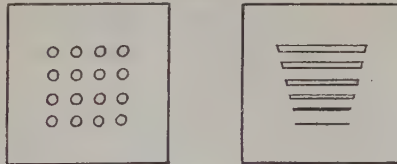
im hängenden Tropfen zu beobachten, und wird in dieser Hinsicht auf die einschlägigen speziellen Kapitel verwiesen.

Auch zum Studium der fermentativen Eigenschaften der Bakterien haben *Přibram* und *Halle* den hohlgeschliffenen Objektträger mit Erfolg dann benutzt, wenn es sich um Reaktion mit Substanzen handelt, deren Herstellung entweder mit sehr großen Kosten verbunden oder deren Ausbeute nur sehr klein ist. Sie füllen den ganzen Hohlraum des hohlen Objektträgers mit der entsprechenden Nährlösung (z. B. verschiedenste Zuckerarten), impfen dieselbe, und legen unter Vaselineabschluß und unter Vermeidung von Luftblasen ein Deckglas darüber. Nach relativ kurzer Zeit der Bebrütung und unter Verwendung minimalster Substanzmengen kann man so unter dem Mikroskope den Ausfall des Versuches feststellen.

Im hängenden Tropfen von Nährlösungen kann man das Auskeimen der Sporen zu vegetativen Formen bei Bakterien, Hefen und Pilzen, Ketten und Fadenbildungen, Teilungs- und Sprossungsvorgänge beobachten.

Schließlich dient der hängende Tropfen in etwas modifizierter Form auch zur Anlegung sog. „Einzellkulturen“ nach *Lindner* (s. an anderer Stelle: Artikel von *Burri* und *Lindner*).

Fig. 95.



Punkt- und Strichverfahren zur Anlage der „Einzellkultur“.

Das *Lindnersche* Verfahren empfiehlt sich besonders bei Hefen und Pilzen, weil hier die Größe der einzelnen Zellen oder Sporen die Feststellung des Vorhandenseins wirklich nur eines einzigen Elementes in einem bestimmten Tröpfchen leicht erlaubt. Bei Bakterien verwendet man dagegen zweckmäßiger das Einzellkulturverfahren nach *Burri*, wobei in derselben Weise das Material in einzelne Tröpfchen steriler Tusche übertragen wird. Nach dem Antrocknen der Tusche legt man das sterile Deckgläschen mit den Tuschepunkten nach unten gekehrt auf eine noch feuchte Agar- oder Gelatineplatte, sucht mit dem Mikroskope dasjenige Tuschepunktchen aus, welches nur einen Keim enthält und verfolgt nun das Auswachsen zur Kolonie aus dieser einen Zelle unter dem Deckglase direkt auf der Agar- oder Gelatineplatte (s. den Artikel von *Burri*, Das Arbeiten mit der einzelnen Bakterienzelle).

Nach dem ursprünglich *Kochschen* Verfahren trocknet man eine sporenhaltige Flüssigkeit an sterilem Deckgläschen an, bringt dieses

dann mit einem Tropfen Nährlösung befeuchtet auf einen sterilen Objektträger gelegt in eine feuchte Kammer, und beobachtet in kurzer Zeit das Auskeimen der Sporen. Um die Untersuchung mit Immersion bei Verwendung des klebenden Zedernöles zu erleichtern, hat *Paltauf* an Stelle von Nährlösung die Verwendung von Nährgelatine empfohlen, wodurch das Deckglas am Objektträger besser fixiert und die Betrachtung und das Absuchen mit Immersionen sehr erleichtert wird.

Allerdings sind zur vollkommenen Ausführung dieses Versuches zumeist noch Hilfsapparate notwendig, um während der ganzen Dauer der Beobachtung eine für diese Vorgänge günstige und gleichmäßige Temperatur zu erhalten. Diesen Zweck erfüllt der heizbare Objektisch.

Der heizbare Objektisch.

Der erste heizbare Objektisch wurde von *Max Schultze*, später in verbesserter Form von *Stricker* angegeben. Im wesentlichen bestanden diese Apparate aus einem hohlen Metallkästchen, welches mit Wasser angefüllt war. Durch das Wasser lief ein nach außen überragender Metallstab, eine sog. Heizstange, die am überragenden Ende mit einem Bunsenbrenner erwärmt und so zur Wärmequelle für das Wasser in der Kammer wurde.

Da es aber ganz unmöglich war, mit diesen Apparaten auch nur einigermaßen konstante Temperaturen einzustellen, erfüllten sie ihren Zweck nur in unzureichendem Maße. Deshalb wurde in der Folge eine ganze Reihe von Apparaten konstruiert (*v. Flesch, Vignal, Löwit, Babes, Stein, Kraus* u. s. w.), von denen die wichtigsten hier kurz besprochen werden sollen. Die betreffenden beigegebenen Abbildungen wurden mir von den optischen Werken der Firma C. Reichert in Wien, die diese Apparate erzeugt, in freundlichster Weise zur Verfügung gestellt. Die verbesserten heizbaren Objektische ermöglichen es nicht nur, sehr konstante Temperaturen beizubehalten, es ist auch insbesondere bei dem von *Kraus* angegebenen Apparat möglich, die jeweiligen Temperaturen rasch zu wechseln, was für gewisse Untersuchungen unbedingt nötig erscheint.

Der heizbare Objektisch nach Prof. *Löwit* (siehe Fig. 96). Die Erwärmung des Objektes wird hier durch Zufluß von heißem Wasser bewirkt. Der Heiztisch selbst besteht aus einer Messingplatte, welche von einem System von Kanälen nach allen Richtungen gleichmäßig durchzogen ist, die in der Figur durch Striche angedeutet sind. Diese Kanälchen münden an den schmalen Enden der Platte in je ein röhrenförmiges Ansatzstück *B* und *B'*, von denen eines für den Zu- und das andere für den Abfluß dient. An der oberen Seite des Heiztisches ist ein Thermometer eingelassen, welches es ermöglicht, Temperaturen von 0—80° abzulesen. In einer zentralen Ausnehmung des heizbaren Objektisches ist überdies ein Kondensor *C* eingesetzt, so daß der Apparat auch.

mit den stärksten Vergrößerungen in Verwendung gezogen werden kann. Der Heiztisch wird am Mikroskoptische mit Hilfe zweier seitlicher Fixierschrauben *A* und *A'* befestigt.

Die Erwärmungsvorrichtung nach Dr. *Spietschka* (s. Fig. 97). Diese Erwärmungsvorrichtung ist eine Ergänzung des heizbaren Objektisches nach Prof. *Löwit*. Sie besteht aus einem spiralförmig gewundenen Metallrohr *B*, welches auf einem Dreifußgestell aufgelegt und mit einem Bunsenbrenner *P* erwärmt wird. Diese Heizspirale

Fig. 96.

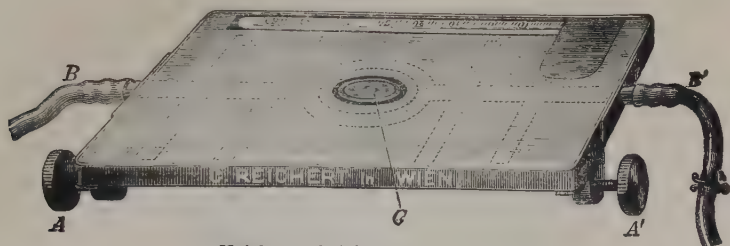
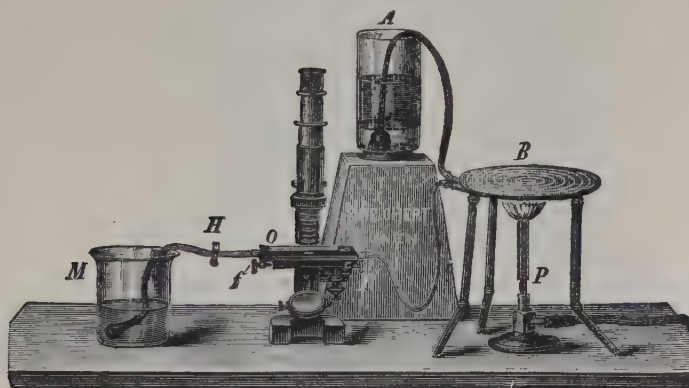
Heizbarer Objektisch nach *Löwit*.

Fig. 97.

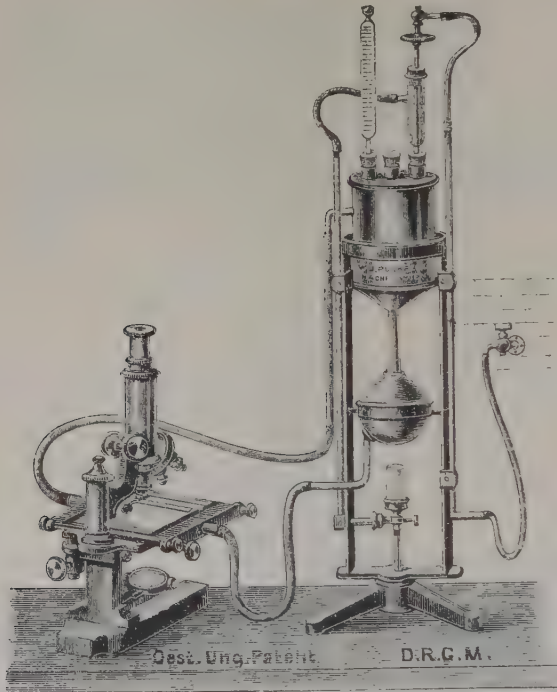
Heizbarer Objektisch nach *Spietschka*.

wird durch Schläuche einerseits mit dem erhöht aufgestellten, mit Wasser gefüllten Gefäße *A*, und anderseits mit der Zuflußöffnung des heizbaren Objektisches verbunden. Die Abflußöffnung des letzteren wird durch einen Schlauch mit dem Abflußgefäße *M* in Verbindung gesetzt. Der Quetschhahn *H* reguliert den Wasserdurchfluß, und der Bunsenbrenner ist mit automatischer Regulierung zur Einhaltung gleichmäßiger Temperaturen versehen.

Der heizbare Objektisch nach *R. Kraus* (s. Fig. 98) besteht aus einem hohlen Objektische aus Glas und dem Heizgefäß. Das Heizgefäß besteht aus dem unteren Siedegefäß und dem oberen zylindrischen Wasserreservoir. Das Heizgefäß und Siedegefäß sind mittels

Schlauches mit dem Objektische verbunden, und dieses geschlossene Gefäßsystem wird mit ausgekochtem destillierten Wasser vorsichtig gefüllt. Im unteren Siedegefäß wird das Wasser erwärmt, steigt infolgedessen durch das enge konische Verbindungsrohr rasch in das obere Reservoir, wogegen das dem Objektische zunächst befindliche Wasser in das Siedegefäß nachströmt. Hierdurch entsteht eine Zirkulation, die so lange andauert, bis alle Wasserteilchen im Zirkulationssystem gleichmäßig erwärmt sind. Dadurch aber, daß das System (Schlauchleitung, hohler

Fig. 98

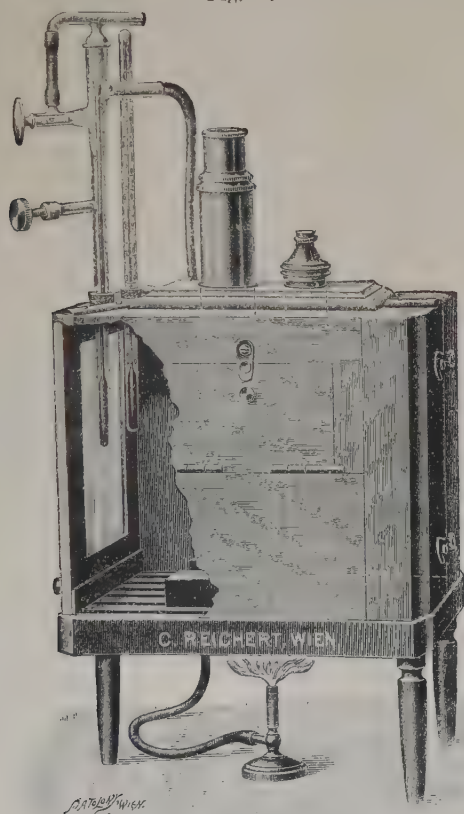


Der heizbare Objektisch nach R. Krus.

Objektisch, Oberfläche des Wassers) einer steten gleichmäßigen Abkühlung durch die umgebende Luft ausgesetzt ist, bleibt eine Ungleichmäßigkeit der Temperierung der verschiedenen Schichten des Wassers im System bestehen, so daß niemals eine vollkommen gleichmäßige Temperierung aller Wasserteilchen im System eintreten kann, wodurch natürlich einmal die Zirkulation zum Stillstand gebracht würde. Im Gegenteile, es wird konstant das im Siedegefäß erwärmte Wasser aufsteigen und das kältere nachfolgen, so daß eine ständige Zirkulation und damit eine fortwährende Speisung des Objektisches mit warmem Wasser erzielt wird. Dadurch ist es möglich, eine konstante erwärmte Wasserquelle tagelang durch den heizbaren Objektisch durchzuführen,

deren konstante Temperatur durch Einschaltung eines Wärmeregulators für den Mikrobrenner erhalten werden kann. Diese Temperatur wird durch ein im Reservoir und ein im Objektische befindliches Thermometer angezeigt, und wenn auch zwischen beiden Thermometern Temperaturdifferenzen bis zu 8° konstatiert werden, so bleibt doch diese

Fig. 99.



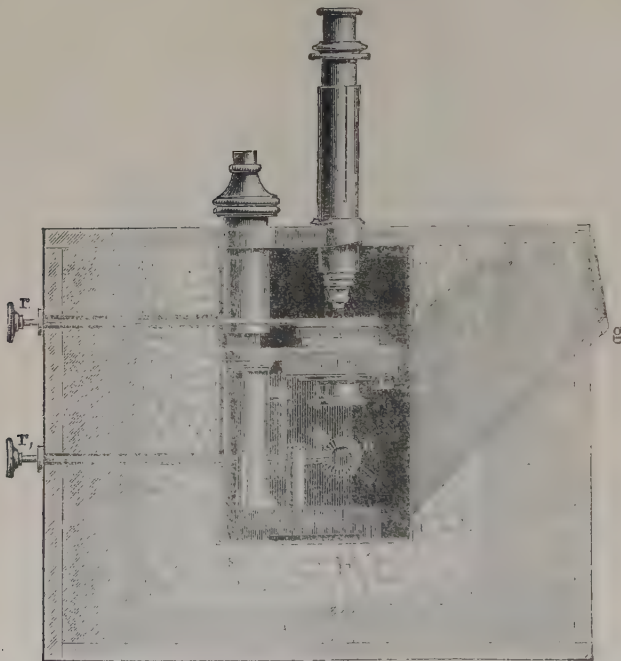
Wärmekasten nach Pfeiffer.

Differenz der Temperaturen des Wassers im Reservoir und im Objektische selbst eine konstante, man braucht nur die Temperatur im Reservoir jeweils um die Höhe dieser Differenz zu erhöhen, was durch geeignete Einstellung des Mikrobrenners leicht möglich ist. Das zu untersuchende Objekt liegt auf dem heizbaren Glastische und kann mit Trocken- und Immersionslinsen untersucht werden. Dabei muß man allerdings bedenken, daß wiederum die Temperatur auch zwischen dem aufliegenden Objekt und dem Objektische selbst verschieden ist, sie

beträgt bei diesem System ungefähr wieder 4° , was sich jeweils auf Grund des Schmelzpunktes des reinen Menthols (bei 37°) feststellen läßt. Dementsprechend muß man beispielsweise, wenn man im Objekte selbst eine Temperatur von 37° (Schmelzpunkt des Menthols) erreichen will, die Temperatur des Objektisches auf 41° , jene im Reservoir auf 49° einstellen. Dadurch wird eine konstante Temperatur im Objekte von 37° und eine ständige Zirkulation im Systeme erreicht.

Der heizbare Wärmekasten nach Pfeiffer (s. Fig. 99). Dieser Apparat wird ebenfalls dann in Verwendung gezogen, wenn es

Fig. 100.



Gefrierapparat nach Molisch

sich darum handelt, ein Objekt längere Zeit hindurch unter dem Mikroskope bei genau einzuhaltender erhöhter Temperatur zu beobachten. Der hierzu verwendete Wärmekasten besitzt drei vertikale Holzwände und eine Glaswand, welche letztere die Zufuhr des Lichtes zum Mikroskope vermittelt. Der Kasten ist kofferähnlich aufklappbar zur Aufnahme des Mikroskopes, und in der Decke befinden sich mehrere Öffnungen für den Tubus, die Mikrometerschraube, den Thermoregulator und das Thermometer. Das Mikroskop ruht auf einem Rost, und die Erwärmung des Kastens geschieht mittels Bunsenbrenners und Thermoregulators.

Es wurden auch elektrisch heizbare Objektische konstruiert, so von Kraus und Ehmann, bei welchen eine Silberspirale durch ein mit

Paraffinöl gefülltes Kästchen läuft, auf welchem das Objekt aufliegt. Die Silberspirale wird von dem durchlaufenden elektrischen Strom, dem ein Widerstand vorgeschaltet wird, erwärmt, und erwärmt auf diese Weise das Paraffinöl, ohne daß es hierbei, wie etwa bei Wasserfüllung zu einer elektrolytischen Zersetzung käme. Auch *Zwintz* und *Thien* haben einen elektrisch heizbaren Objektisch angegeben, der durch Einschaltung eines Luftmanometers sehr konstante Temperaturen garantieren soll.

Will man den Einfluß niedriger Temperaturen auf Mikroorganismen studieren, dann bedient man sich des Gefrierapparates nach *Molisch* (s. Fig. 100). Derselbe besteht aus einem dreiwandigen Zinkkasten, der innen eine Aushöhlung für die Aufnahme des Mikroskopes besitzt. Durch Zwischenwände wird der ganze Hohlraum in mehrere Kammern geteilt; in der innersten, in der Figur schwarz gehaltenen Kammer, befindet sich das Mikroskop, die nächste Schichte *E* ist mit Eisstückchen beschickt, wogegen die äußerste Schichte *A* eine mit Sägespänen gefüllte Isolierschichte darstellt. Das Mikroskop wird von oben eingeführt und durch eine Deckplatte abgedichtet, während der Zutritt des Lichtes zum Mikroskop durch einen schräg nach auswärts gerichteten Kanal, der oben mit Glas abgedichtet ist, ermöglicht wird. Das Mikroskop ist mit einem beweglichen Objektische versehen, die Bewegung selbst geschieht von außen mit Hilfe einer Ferneinstellungsvorrichtung *R*. Ebenso wird auch der Mikroskopspiegel mit Hilfe einer Ferneinstellung *R'* verstellt.

Zum Studium des ungefärbten Präparates dient ferner das von *Burri* angegebene

Tuscheverfahren*.

Dieses einfache, leicht ausführbare Verfahren, hat sich für die Untersuchung und die Diagnostik gewisser Mikroorganismen eine ganz besondere Stellung errungen. Die Herstellung des Präparates geschieht in der Weise, daß man einen Tropfen des zu untersuchenden Materiales, wie etwa Blut oder flüssige Bakterienkultur, mit einem Tropfen feinsten chinesischer Tusche mischt und auf dem Objektträger ausstreicht, bis der Ausstrich einen bräunlichen Ton aufweist. Ist der Ausstrich resp. die Schichte richtig getroffen, dann liegen diejenigen Teilchen des Objektes, welche größer sind als die winzigen Tuschekörnchen, von diesen unbedeckt zwischen einem gleichmäßig von Tusche erfüllten Felde. Betrachtet man ein derartiges Objekt unter dem Mikroskope unter starker Beleuchtung, dann werden die in das Objekt fallenden Lichtstrahlen von der Tusche zurückgehalten und nur dort in das Linsensystem eingelassen, wo sich Objektteilchen befinden, von denen infolge ihrer Größe die Tuscheteilchen abgerutscht sind, die also unbedeckt und ungefärbt die Lichtstrahlen durchlassen. Derartige Objektteilchen er-

* S. auch den Artikel von *Giemsa*: „Methoden der Färbung der Protozoen“ in diesem Handbuch und *Burri*.

scheinen dann in dunklem Untergrunde, im schwarzen Gesichtsfelde hell leuchtend mit scharfer Kontur. Für die richtige Herstellung eines Präparates ist die Art des Ausstreichens und die der verwendeten Tusche von größter Wichtigkeit.

Der Ausstrich selbst darf nicht zu dick und nicht zu dünn sein, weil in ersterem Falle selbst größere Objektteilchen in der dickeren Schichte von den kleinsten Tuscheteilchen überlagert, im anderen Falle aber die Abhaltung des Lichtes durch eine zu dünne Tuscheschichte unvollkommen und die Kontur der Objektteilchen unscharf zu erkennen sein würden. Für die Verteilung des Ausstriches bedient man sich der Öse, der Kante eines Deckgläschens oder nach *Gins* eines Objektträgers, dessen Kante an der Schmalseite mit einer feinen runden Feile oder am Schleifsteine derartig abgeschliffen wurde, daß an Stelle der Kante eine, ungefähr unter 45° geneigte Fläche entsteht. Die beiden Ecken der beschliffenen Kante bleiben aber unberührt. Mit einem so vorbereiteten Objektträger zieht man mit dieser Kantenfläche in gleichmäßigem Zuge den Tuschetropfen über den Objektträger, wobei man die Dicke der zu erhaltenden Tuscheschichte jeweils verändern kann, je nach dem Winkel, den die abgeschliffene Fläche des Ausstreichers mit dem Objektträger bildet.

Was die Tusche selbst betrifft, so muß dieselbe, da sie oft viele bakterielle Verunreinigungen und gröbere Tuschekörnchen enthält, nach dem Sterilisieren durch Sedimentieren oder Zentrifugieren von allen unerwünschten Beimengungen befreit werden, bis man eine feine homogene Tusche erhält. Man hat auch versucht, derartig vorbereitete Tusche durch Zusatz von chemischen Reagenzien, wie etwa Formol, keimfrei zu erhalten, doch muß man eine derartig konservierte Tusche für die Verwendung von Blutpräparaten ausschließen, weil die roten Blutkörperchen insbesondere durch Formol stark geschädigt werden.

Die Tuschepräparate haben eine ganz besondere Bedeutung für die Ermittlung sehr feiner Gebilde, wie z. B. der *Spirochaeta pallida*, und ganz besonders für die Diagnosestellung in frischen Efflorescenzen und Gewebsabstrichen erhalten, weil bei diesen Präparaten die Konturen mit minutiösester Deutlichkeit zu erkennen sind, was ja gerade für die Differentialdiagnose der im allgemeinen schwer färbbaren Spirochäten von größter Wichtigkeit ist. Aber auch Bakterien, Pilze, Trypanosomen u. s. w., ja selbst Geißeln von Spirillen und Geißelzöpfe peritricher Bakterien lassen sich auf diese Weise darstellen; dagegen lassen sich Einzelgeißeln, die zufolge ihrer Kleinheit von den Tuschekörnchen bedeckt werden, auf diese Weise nicht mehr zur Darstellung bringen, wohl aber lassen sich noch die sehr kleinen, im Blute von Krebsmäusen häufig vorhandenen Mäusespirillen nach *Gins* auf diese Weise gut veranschaulichen. Auch die charakteristischen Formen des *Diphtheriebacillus*, wie etwa Keulen-, überhaupt Involutionsformen, werden im Tuschepräparate mit großer Deutlichkeit sichtbar, und desgleichen kann man auf diese

Weise auch die Kapseln der Bakterien insbesondere dann schön zur Darstellung bringen, wenn man das Tuscheverfahren mit Färbeverfahren kombiniert, wobei die ungefärbt bleibenden Kapseln als helle Zone scharf im Vordergrund stehen, und die gefärbten Bakterienkörper umrahmen.

Ein dem Tuscheverfahren ähnliches wurde von *Nitsche* unter Verwendung von kolloidalem Silber (Collargol) angegeben. Dieses Collargolverfahren deckt sich im wesentlichen mit der Herstellung der Tuschepräparate, soll aber nach *Nitsche* den Vorteil haben, daß infolge der feineren kolloidalen Verteilung und Molekulargröße des Silbers noch kleinere Objektteilehen sichtbar gemacht werden können als mit Hilfe des Tuschepräparates. Ein Unterschied in der Herstellung des Collargolpräparates besteht insoferne gegenüber dem Tuscheverfahren, als man hier zuerst das zu untersuchende Material am Objektträger antrocknen läßt und dann erst das mit destilliertem Wasser verdünnte Collargol darüber ausstreicht und trocknet. Sowohl die Tuschepräparate als auch die Collargolpräparate können, nachdem sie lufttrocken und eventuell durch die Flamme fixiert worden sind, direkt auch unter der Immersion ohne Deckgläschen betrachtet werden. Saure Präparate, etwa gesäuerte Milch, müssen bei Verwendung des Collargolverfahrens erst neutralisiert werden. Sehr schleimige Kulturen, wie etwa *Azotobakter*, sind ungeeignet für Tusche- und Collargolpräparate.

Will man die ungefärbten Objekte in lebendem Zustande und scharf konturiert im dunkeln Untergrunde (Gesichtsfeld) betrachten, dann bedient man sich der sog. **Dunkelfeldbeleuchtung**, die allerdings eines eigenen Apparates bedarf und nicht wie das Tuschepräparat von jedem Praktiker ohneweiters ausgeführt werden kann, sofern demselben nur ein gutes Mikroskop zur Verfügung steht.

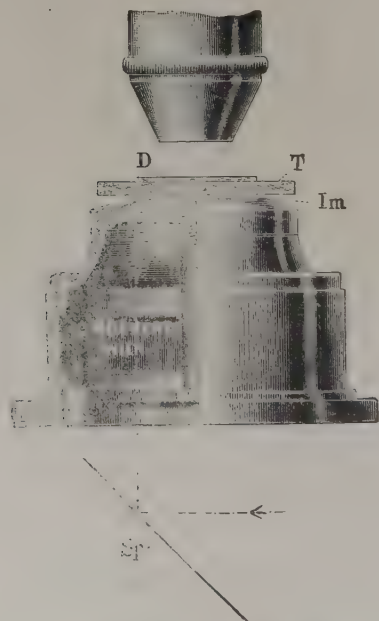
Die Dunkelfeldbeleuchtung.*

Zur Betrachtung lebender ungefärbter Objekte im Dunkelfeld benutzt man ein einfaches Deckglaspräparat, d. h. man bedeckt auf planem Objektträger einen Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit, etwa Blut, Sekret oder mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnte Gewebsabstriche oder Bakterienkulturen mit einem Deckgläschen. Das Wesen der Dunkelfeldbeleuchtung besteht darin, daß man dem Objekte die Lichtstrahlen unter einem solchen Winkel zuführt, daß sie von dem Linsensystem der Objektive des Mikroskopes nicht aufgenommen werden können. Das hat dann zur Folge, daß der Untergrund, also das Gesichtsfeld im Mikroskope völlig dunkel erscheint, wogegen jene Teilchen des Objektes, welche die auf sie treffenden Lichtstrahlen weiter zu reflektieren und in die Linse des Objektives abzubiegen vermögen, als

* S. auch den Artikel von *Jentzsch-Graefe*, „Über Dunkelfeld und Ultramikroskopie.“

hell leuchtende Elemente in diesem dunklen Grunde erscheinen. Zu diesem Zwecke müssen natürlich vor allem die zentralen Strahlen ausgeschaltet werden, und zum Verständnisse für das Wesen der Dunkel-feldbeleuchtung diene eine Abbildung über den Strahlengang eines nach der Konstruktion von *Stephensen* von der Firma Reichert zu diesem Zwecke konstruierten Spiegelkondensors. Dieser Spiegelkondensor (s. Fig. 101) besteht aus einer plankonvexen Linse L , bei welcher der mittlere Teil der gekrümmten Fläche abgeschnitten ist. Die dadurch entstandene Planfläche steht genau parallel zur Planfläche der Linse, und der noch übrig bleibende Teil der Krümmung ist versilbert. Die Strahlen,

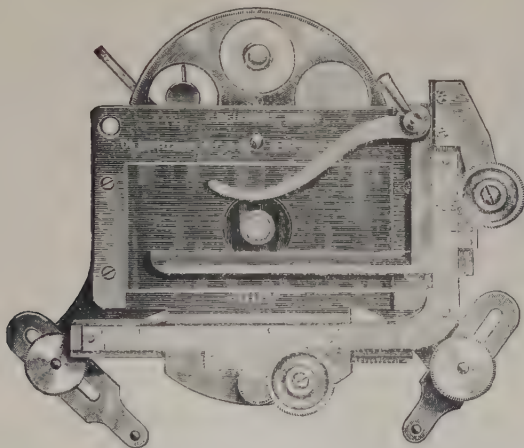
Fig. 101.



welche die Linse direkt durchsetzen würden, werden durch eine zentrale Blende B zurückgehalten, so daß überhaupt nur Lichtstrahlen an die versilberte sphärische Fläche gelangen können, die den in Fig. 101 angegebenen Weg nehmen. Diese Strahlen treffen im dargestellten Falle bei Trockenobjektiven unter so schrägem Winkel auf die Oberfläche des Deckglases (D), daß sie total nach abwärts reflektiert werden und auf diese Weise gar nicht als Lichtstrahlen in das Linsensystem gelangen, das Gesichtsfeld also nicht erleuchten. Treten derartige Lichtstrahlen aber an kleinste Partikelchen des Objektes, von denen sie abgelenkt werden, dann treffen sie unter weniger schrägem Winkel auf das Deckglas, so daß sie nicht mehr reflektiert, vielmehr in das Linsensystem abgelenkt werden, wodurch die Objektteilchen selbst im dunkeln Felde belichtet erscheinen. Im Objektiv ist eine eigene Blende eingeschaltet, zur Ab-

haltung der Randstrahlen. Zwischen dem Objektträger und dem Kondensor muß stets eine Immersionsflüssigkeit (*Im*), z. B. ein Tropfen Zedernholzöl, aufgetragen werden, um den Lichtzutritt vom Kondensor in das Präparat ohne Strahlenbrechung zu ermöglichen. Sehr praktisch sind auch die von der Firma Reichert in Wien konstruierten Spiegelkondensoren in Plattenform oder die Universalkondensoren (siehe Fig. 102), weil sie an jedem Stativ angebracht werden können. Ein derartiger Universalkondensor besitzt unterhalb der Spiegellinse eine drehbare Scheibe, die mit einer Anzahl verschieden großer Blenden, ferner einer Mattscheibe und einer plankonvexen Linse ausgerüstet ist. Die verschiedenen Blenden der drehbaren Scheibe haben den Zweck, die für jede Lichtquelle und jedes Objektiv

Fig. 102.



günstigste Begrenzung der Öffnung des Strahlenkegels zu erzielen, und erlauben uns dadurch, den Kondensor für alle Arten von Lichtquellen für alle Vergrößerungen mit gleichem Vorteile zu gebrauchen. Bei Einschaltung der Mattscheibe oder der plankonvexen Linse erhält man durchfallendes Licht, wodurch der Vorteil gegeben ist, daß man das im Dunkelfeld Geschehene, sofort an der Hand des gewohnten durchleuchteten Bildes kontrollieren kann. Bei Verwendung der Immersionslinse muß auch hier zur Abhaltung von Randstrahlen eine Röhrenblende oberhalb der Objektivlinse eingeschaltet werden (Fig. 103, *b*).

Einer der allerbesten Dunkelfeldapparate ist der von *Siedentopf* konstruierte und von der Firma *Zeiß* erzeugte Paraboloidkondensor. Bei diesem System werden die Strahlen nicht durch Brechung, sondern durch Spiegelung gesammelt und vollständig vereinigt. Der Kondensor wird durch einen plankonvexen Glaskörper dargestellt (Fig. 104, *K*), dessen konvexe Krümmung ein Rotationsparaboloid

darstellt, von welchem aus die Strahlen in einen Fokus reflektiert werden, der sich im oberen Rande des Objekträgers (F) befindet. Unter dem Kondensor ist eine zentrale Blende angebracht (B), so daß nur solche Strahlen an die konvexe Spiegelfläche des Kondensors herantreten können, deren Apertur größer ist als 1·0 und von diesen wiederum werden nur jene in den Fokus reflektiert, deren Apertur 11—14 beträgt. Diese in den Fokus reflektierten Strahlen können aber nicht in das Linsensystem des Okulars gelangen, ausgenommen dann, wenn sie von kleinsten Teilchen, auf die sie hier treffen, neuerlich reflektiert und in das Linsensystem abgelenkt werden. Sind solche Teilchen im Fokus, also auf dem Objekträger vorhanden, dann erscheinen sie selbst hell leuchtend im dunklen Gesichtsfelde, mit scharfen Konturen sich davon abhebend.

Fig. 103.

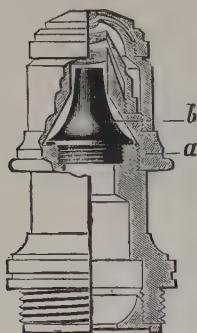
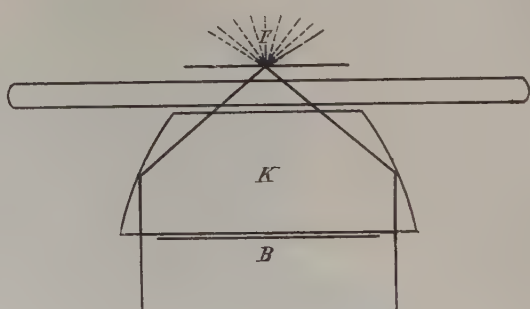


Fig. 104.



In dem von der Firma C. Leitz hergestellten und von Professor *F. Jentsch* konstruierten Spiegelkondensor beruht die Wirkung auf der Strahlenspiegelung zweier Spiegelflächen, von denen die eine konkav, die andere konvex ist. Auch hier gelangen nur gespiegelte, keine gebrochenen Strahlen in das Objekt, wodurch Farbenfehler ausgeschaltet sind.

Die Dunkelfeldbeleuchtung findet ihre Anwendung vorwiegend zur Betrachtung lebender, ungefärbter Objekte, insbesondere wie erwähnt, zur Sichtbarmachung und Differenzierung der *Spirochaeta pallida*, zur Untersuchung der Bewegungserscheinungen von Protozoen und Blutparasiten, Amöben, Trypanosomen, Recurrensspirillen u. s. w., zur Sichtbarmachung der Geißeln lebender Bakterien und zum Auffinden ultramikroskopischer Teilchen, die durch das von ihnen abgelenkte Licht als helle Scheibchen, als sog. Beugungsscheibchen zur Beobachtung gelangen. Vor allem in der Syphilisdiagnose, zum Auffinden vorhandener Spirochäten im Blute und frischen Gewebsteilen hat die Dunkelfeldbeleuchtung sich neben dem Tuschepräparat einen wichtigen Platz erobert. Die Objekte müssen stets in flüssigem Zustande betrachtet, Gewebsteilchen also in physiologischer

Kochsalzlösung aufgeschwemmt und entsprechend zerrieben oder zerzupft werden.

In neuester Zeit empfiehlt *Hoffmann** die Dunkelfeldbeleuchtung auch zur Untersuchung gefärbter Objekte, u. zw. sowohl von Ausstrichen als auch von Schnittpräparaten. Diese Methode soll zur Sichtbarmachung der Spirochäten sogar bessere Dienste leisten, als die Betrachtung des ungefärbten oder des gefärbten Objektes jede für sich im Hell- oder Dunkelfelde allein. Silbergeschwärmte Spirochäten erhalten im Dunkelfelde ein hell strahlendes Aussehen, leuchten weiß im dunklen Untergrunde auf, und rötlich gefärbte fluoreszieren grünlich, immer aber heben sich die Spirochäten bei dieser Methode prägnant und leicht erkennbar vom Untergrunde ab. Aber auch solche Spirochäten, die nur wenig Farbstoff aufgenommen und im gefärbten Präparate nur schwer erkennbar, sich leicht der Beobachtung entziehen, werden im Dunkelfelde leicht sichtbar. Dieses von *Hoffmann* „Leuchtbildmethode“ genannte Verfahren eignet sich außer für Spirochäten besonders zur Auffindung nach *Ziehl-Nelson* gefärbter Tuberkelbacillen, die im Dunkelfelde gelbgrün fluoreszieren, wodurch sogar kleine Granula dem Beobachter deutlich sichtbar werden. Geeignet ist die „Leuchtbildmethode“ auch zur Untersuchung der Leprabacillen, von Haar- und Hautpilzen, Sporenträgern, vital gefärbten Bakterien und Protozoen, Chromatophoren u. dgl. Nach *Hoffmann* erscheinen blaugefärbte Mikroorganismen im Leuchtbilde braun, rote aber grün. Auf die Betrachtung gefärbter Präparate im Dunkelfelde hat zuerst *Arning* hingewiesen, aber erst in neuester Zeit wurde diese ganz in Vergessenheit geratene Methode von *Hoffmann* systematisch geprüft und gewertet, und die zu erwartende technische Vervollkommenung der optischen Apparate und Systeme läßt noch viel Wertvolles von ihr erwarten, umsomehr als heute schon der von der Firma Zeiß konstruierte Wechselkondensor die unmittelbare Kontrolle des im Dunkelfeld Gesehenen im Hellfelde und umgekehrt gestattet. Nach *Hoffmann* ist es zur Erzielung eines guten „Leuchtbildes“ unbedingt notwendig, sich die Lichtquelle durch Einlegen einer halbgeölten Mattscheibe für die Untersuchung geeignet zu machen, auch müssen die gefärbten Präparate durch Differenzieren eventuell durch Entfärben des Untergrundes eine entsprechende Vorbehandlung erfahren, welche Sache der Erfahrung und Technik ist. Für das Zustandekommen der Fluorescenz oder des Aufleuchtens der gefärbten oder imprägnierten Mikroorganismen sind keineswegs alle Färbemethoden gleicherweise geeignet, bisher ergaben die üblichen Methoden zur Darstellung der Spirochäten, die *Ziehl-Nelson*sche Carbol-fuchsin-Methylenblau-, ferner die Chininblau- und Methylenviolett-färbung die besten Resultate, doch steht zu erwarten, daß weitere Forschungen auf diesem Gebiete noch manches wertvolle Ergebnis bringen werden.

* S. den Artikel von *E. Hoffmann*, S. 70.

2. Abteilung:

Färbung.

Theorie der Bakterienfärbung.

Von **Philipp Eisenberg**, Krakau.

Es gibt drei Methoden der Bakterioskopie, u. zw.:

1. die Beobachtung von Bakterien in ungefärbtem Zustand im sog. Nativpräparat; 2. die Beobachtung verschieden gefärbter Bakterien und 3. die Negativdarstellung von Bakterien als farbloser Gebilde auf gefärbtem Grunde. Jede dieser Methoden hat infolge ihrer Eigenart ihre besonderen Vor- und Nachteile und einen ihr angemessenen Anwendungsbereich.

Die Beobachtung in ungefärbtem Zustand erfolgt entweder in gewöhnlichem „hellen Feld“ oder im sog. Dunkelfeld bzw. im ultramikroskopischen Bild oder endlich indirekt mit Hilfe der Photographie im ultravioletten Licht. Infolge der Kleinheit der Objekte sowie ihres meist geringen Lichtbrechungsvermögens liefert die gewöhnliche Beobachtung ungefärbter Bakterien nur summarische und mit Kritik zu verwendende Aufschlüsse über ihre Gestalt und ihre Struktur. Sie ist aber unersetzlich wenn es sich darum handelt, Lebensvorgänge der Bakterien in Kontinuität zu studieren, wie Eigenbewegung, Vermehrung, Sporulation, Plasmolyse, verschiedene Taxien, auch wird sie immer eine willkommene Ergänzung und Kontrolle von Färbungsergebnissen abgeben. Die Darstellung im Negativbild soll im Anhang einer besonderen Besprechung unterzogen werden.

Die zweifellos wichtigste und meistgebräuchliche unter den drei Methoden ist aber diejenige der Bakterienfärbung. Dieselbe verfolgt einerseits einen rein deskriptiven Zweck, indem sie bestrebt ist, die Bakterienzelle und ihre morphologischen Bestandteile besser zu veranschaulichen, als die Beobachtung in ungefärbtem Zustand es zu tun vermag. Andererseits will sie eine Differenzierungsmethode sein, die auf Grund färberischer Unterschiede es ermöglicht, physikalische, physikalisch-chemische oder chemische Unterschiede zwischen verschiedenen Anteilen der Bakterienzelle bzw. zwischen verschiedenen Bakterienarten zu eruieren und differentialdiagnostisch zu verwerten. Wieviel oder besser gesagt wie wenig gerade auf letzterem Gebiet sich hat erreichen lassen, wird aus unseren weiteren Erörterungen erhellen.

Im folgenden sollen die theoretischen Grundlagen der Bakterienfärbung in ihren Hauptzügen wiedergegeben werden. Ihre Kenntnis ist unerlässlich für jeden, der Bakterienfärbung rationell

treiben will und mit grober Empirie und blinder, verständnisloser Befolgung von Färbungsrezepten sich nicht begnügt. Sie erlaubt eine Orientierung in dem oft verwirrenden Chaos der verschiedensten Methoden, zum Teile auch eine kritische Bewertung und rationelle Auswahl derselben. Auch bei der Beurteilung der Färbungsergebnisse und ihrer differentialdiagnostischen Ausnutzung sollte sie immer zu Rate gezogen werden. Manche zu weitgehenden Schlüsse hätten vermieden werden können, wenn man dieser Forderung Rechnung getragen hätte.

Es sollen nun zunächst die allgemeinen Prinzipien der Färbung kurz dargestellt werden, sodann aber die speziellen Probleme der Bakterienfärbung Berücksichtigung finden.

I. Allgemeine Prinzipien der histologischen Färbung.

A. Über organische Farbstoffe und ihre färberischen Eigenschaften.

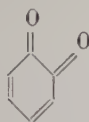
Die histologischen Färbungen lehnen sich zum großen Teil an die Erfahrungen und Methoden der industriellen Textilfaserfärbung an, vor allem aber verwenden sie zumeist diejenigen Farbstoffe, die für industrielle Zwecke hergestellt werden. Eine der wichtigsten Schwierigkeiten, die sich der theoretischen Erforschung des Färbeprozesses entgegenstellen, ist die durch den Herstellungsprozeß oder sonstige technische Anforderungen (Haltbarkeit, physikalische Beschaffenheit) bedingte Unreinheit der meisten von der Technik gelieferten Farbstoffe.

Es sind entweder zufällige unerwünschte Beimengungen von Nebenprodukten der Fabrikationen, oder Reste von Salzen, mittels deren die Farbstoffe ausgesalzen werden, oder endlich besondere Zusätze, die Doppelsalzbildung (ZnCl_2 , NaHSO_3) oder besondere technische Qualitäten der Farbstoffe bezwecken. (Die Chemiker sprechen vom „Stellen“ der Farbstoffe, z. B. von Gentianaviolett mit Dextrin.) Während im gewöhnlichen Sprachgebrauch jeder gefärbte Körper, der einem anderen seine Färbung mitteilen kann, als Farbstoff benannt wird, wird in der Farbchemie der Umfang dieses Begriffes eingeeengt, indem Körper, die in unlöslichem Zustand als Suspension mittels eines Klebemittels auf die Oberfläche eines Körpers gebracht werden und ihm dadurch Färbung verleihen (Malerfarben), als Deckfarben (Pigmente) ausgeschaltet werden. Im farbchemischen Sinne werden diejenigen gefärbten Körper als Farbstoffe bezeichnet, die aus ihren Lösungen tierische oder pflanzliche Fasern, Gewebe oder Zellen anfärben, u. zw. entweder direkt oder unter Mitwirkung anderer Körper (sog. Beizen). Unter diesen Begriff fallen sodann auch gefärbte Körper, die durch den Kontakt der Faser oder des Gewebes mit den (gefärbten oder ungefärbten) Komponenten auf der Faser selbst entwickelt werden, sog. Entwicklungsfarben. Farbstoffe in diesem Sinne gehören fast ausnahmslos dem Gebiete der organischen

Chemie an, die Histologie verwendet von anorganischen Jod, Silber, Gold, Osmium. Nach dem Ausgangspunkt der technischen Produktion werden sie Teerfarbstoffe, weniger sinngemäß auch Anilinfarbstoffe genannt. Die rein chemische Erkenntnis des Aufbaues dieser Stoffe (ebenso vieler sog. „natürlicher“ Farbstoffe) hat in den letzten Jahrzehnten sehr große Fortschritte zu verzeichnen, auch ist dadurch manche glänzende Synthese neuer derartiger Produkte ermöglicht worden. Als angewandte Wissenschaft sucht aber die Farbchemie weiter die Zusammenhänge zu ermitteln, die zwischen der chemischen Konstitution und den färberischen Eigenschaften der Farbstoffe bestehen. Es ist klar, daß die Erkenntnis dieser Zusammenhänge die rationelle Grundlage abgibt für den weiteren Ausbau dieses Wissenszweiges, für die Erzeugung neuer Farbstoffe und für die rationelle Verwendung schon bekannter. Als solche färberisch wichtigen Eigenschaften kommen in Betracht: die Eigenfarbe in qualitativer und quantitativer Hinsicht, die Löslichkeit, die Färbekraft und die Echtheit der erzielten Färbung. Wir wollen nun nachschauen, welche Zusammenhänge hier bestehen.

Fragen wir zunächst, welche Bedingungen ein Körper erfüllen muß, um Farbstoff zu sein. Vor allem sehen wir, daß nur cyclische Verbindungen, die also einen Benzolring, nur selten einen Fünfering enthalten, dazu befähigt sind. Sodann sehen wir in Anlehnung an die von *O. N. Witt* im Jahre 1876 aufgestellte Theorie, daß alle Farbstoffe bestimmte chemische Gruppierungen enthalten, die *chromophore Gruppen* genannt werden. Durch den Eintritt dieser werden sonst ungefärbte Körper zu gefärbten *Chromophoren*, die aber noch keine Farbstoffe sind.

Als chromophore Gruppen können fungieren: die Nitrogruppe $-\text{NO}_2$, die Nitrosogruppe $-\text{NO}$, die Azogruppe (resp. Diazo-) $-\text{N}=\text{N}-$, die Äthylengruppe $>\text{C}=\text{C}<$, die Nitrilgruppe $>\text{C}=\text{N}-$, die Carbonylgruppe $>\text{C}=\text{O}$, die Azingruppe $>\text{N}=\text{N}<$. Nach diesen Gruppen, die dem Farbbildungskern, dem Chromophor, ihren Charakter ausdrücken, werden die Farbstoffe nun in verschiedene chemische Gruppen eingeteilt. In neuerer Zeit ist man unter dem Einfluß der Untersuchungen von *Nietzki*, *Kehrmann* u. a. geneigt, das Gemeinsame der chromophoren Gruppen darin zu erblicken, daß sie den chromophoren eine *chinoid*e Struktur verleihen, d. h. eine Struktur, die es erlaubt, sie als Abkömmlinge des o- oder p-Chinons zu betrachten.



Orthoquinon



Parachinon

oder



Für Körper, die als chromophore Gruppen $>\text{C}=\text{O}$, $>\text{C}=\text{N}-$ oder $>\text{C}=\text{C}<$ führen (Chinonimide, Chinonoxime, Triphenylmethane, Diphenylmethane), kann man ohneweiters die chinoide Struktur annehmen, doch auch für Azo-, Oxyazo-, Nitroso-, Nitro-, Azinfarbstoffe ist dieselbe als möglich, zum Teil als wahrscheinlich erwiesen worden. Als Grund dieser besonderen Eigentümlichkeit der chinoiden Struktur, chromophor zu wirken, werden die darin enthaltenen Doppelbindungen bzw. die dadurch bedingte Beweglichkeit der Atome angesprochen. Die meist gefärbten, aber noch nicht färbenden Chromophore werden zu Farbstoffen erst durch den Eintritt von „salz bildenden Seitenketten“, sauren oder basischen oder beiden zugleich. Wie unten noch eingehender besprochen wird, ist der elektrochemische Charakter der Farbstoffe von großer Wichtigkeit für ihre färberische Funktion. Das farblose Benzol C_6H_6 wird durch Eintritt der chromophoren Azo-Gruppe zum rotgefärbten Chromophor Azobenzol $\text{C}_6\text{H}_7 \cdot \text{N}=\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_5$, das aber noch kein Farbstoff ist, sondern erst durch Anhängen einer salzbildenden Amino- oder Oxygruppe zu Farbstoffen wird: Aminoazobenzol $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{N}=\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$, Oxyazobenzol $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{N}=\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{OH}$. Schon die chromophoren Gruppen als solche drücken den Chromophoren einen gewissen elektrochemischen Charakter auf: die Azin- und Azogruppen sind stark positiv, die Chinonimidgruppe positiv, die Chinongruppe stark negativ; im allgemeinen ist N positiv, C sowie noch mehr O negativ. Je mehr N-Atome also ein Chromophor führt, desto stärker positiv, je mehr C- bzw. O-, desto stärker negativ ist es.

Durch Hinzutritt der salzbildenden Gruppen kann dieser ursprüngliche elektrochemische Charakter des Chromophors noch weitere Änderung im Sinne einer Verstärkung oder Abschwächung erfahren. Die wichtigsten unter diesen Gruppen sind die stark positive NH_2 (bzw. die davon abgeleiteten Alkylamino— $\text{NHR}-$ oder NR_2- und Imino-Gruppe $\text{NH}=\text{}$) und die schwach negative OH-Gruppe. Diese zwei Gruppen werden auch als „auxochrome“ bezeichnet, weil sie in geeigneten Kombinationen den Farbstoffcharakter der Chromophore verstärken. Soll ein Chromophor zum Farbstoff werden, so muß er mindestens eine auxochrome Gruppe enthalten. Eine Aminogruppe an basischem Chromophor angebracht, gibt starke Farbbasen, an saurem schwache. Ein Hydroxyl gibt an basischem Chromophor schwache Farbsäuren, an saurem starke. Treten sowohl eine Amino-, als auch eine Hydroxylgruppe an ein Chromophor, so richtet sich der Charakter des resultierenden Farbstoffes nach dem ursprünglichen Charakter des Chromophors, es entstehen schwach basische oder schwach saure Farbstoffe.

Andere salzbildende Gruppen können an sich Chromophore nicht zu Farbstoffen machen, es muß dazu mindestens eine auxochrome Gruppe mit dabei sein. Hierher sind zu rechnen: die negative Carboxyl- $-\text{CO} \cdot \text{OH}$, Nitroso- $-\text{NO}$ und die stark negative Nitro- $-\text{NO}_2$.

und Sulfogruppe HSO_3 . Der Eintritt auch nur einer Nitrogruppe oder Sulfogruppe macht ein Chromophor, wie es auch an sich beschaffen sein mag, zu einer Farbsäure. Kommt eine Carboxylgruppe mit einer Amino-
gruppe an einem basischen Chromophor zusammen, so entscheidet das Überwiegen der positiven oder negativen Tendenzen über den Charakter des Farbstoffes; aus einem sauren Chromophor wird unter diesen Umständen immer eine Farbsäure, ebenso wenn ein Hydroxyl mit einem Carboxyl an einem beliebigen Chromophor zusammengebracht wird. Nach dem resultierenden elektrochemischen Charakter werden die in dieser Weise entstehenden Farbstoffe in basische und saure eingeteilt. Das bedeutet jedoch nicht, daß sie wirklich als Farbbasen oder Farbsäuren zur Anwendung gelangen, vielmehr geschieht dies meist in Form von Salzen, und es bedeutet somit der Ausdruck „basischer Farbstoff“ ein monacides Hydrochlorid oder Sulfat einer Farbbase, „saurer Farbstoff“ ein neutrales Na-, K- oder Ca-Salz einer Farbsäure. „Basisch“ und „sauer“ gelten also hier nur für den elektrochemischen Charakter des färbenden Bestandteiles des betreffenden Salzes.

Farbstoffe, die verschiedene salzbildende (und auxochrome) Gruppen enthalten, deren antagonistischer elektrochemischer Charakter untereinander ungefähr sich ausgleicht, können die Eigenschaften basischer und saurer Farbstoffe in sich vereinigen und füglich mit *Michaelis* als amphoter bezeichnet werden (etwa wie Aminosäuren). Von ihnen zu unterscheiden sind die sog. neutralen Farbstoffe, die bei der Reaktion von basischen und sauren Farbstoffen entstehen und als farbsaure Salze der Farbbasen aufgefaßt werden. Z. B. pikrinsaures Natron + Chlorid der Methylenblaubase = pikrinsäure Methylenblaubase + NaCl. Sie sind meist wenig wasserlöslich, lösen sich besser in organischen Lösungsmitteln, zuweilen in einem Überschuß der sauren oder basischen Komponente. Endlich können durch Eintritt von elektrochemisch indifferenten Gruppen (Methoxyl- OCH_3 , Äthoxyl- OC_2H_5 , O) Farbstoffe entstehen, die der salzbildenden Gruppen entbehren, daher auch nur durch Lösung von bestimmten Medien (fettartigen Substanzen) gespeichert werden und diese anfärben. Man kann sie nach *Michaelis* als indifferente Farbstoffe bezeichnen.

Zwischen der Konstitution der Farbstoffe und ihrer Eigenfarbe bestehen nach den Untersuchungen von *Nietzki*, *Schütze* u. a. folgende gesetzmäßige Zusammenhänge: Eine große Anzahl organischer Substanzen absorbiert die ultravioletten Strahlen des Spektrums, eine Färbung (u. zw. eine komplementäre) weisen aber nur diejenigen auf, die Teile des sichtbaren Spektrums zu absorbieren vermögen. Durch Eintritt chromophorer Gruppen in die ersteren werden die Absorptionsbänder vom Ultraviolett in den sichtbaren Teil des Spektrums verschoben, u. zw. mit zunehmender Anzahl der Gruppen vom Violett bis zum Purpur, wodurch eine Färbung der betreffenden Produkte zutage tritt, die von Blaußgelb über Orange, Rot, Purpur,

Violett, Indigo, Cyanblau, Blaugrün bis nach Grün geht. Gruppen, die eine Verschiebung der Eigenfarbe in dieser Richtung bewirken, also eine Vertiefung des Farbtones, nennt man nach *Schütze* *bathochrom*, solche, die eine Erhöhung zur Folge haben, *hypsochrom*. Zu den ersteren zählen die meisten der in Betracht kommenden Gruppen mit Ausnahme der Sulfogruppe und der Carboxylgruppe, die in bezug auf Farbenton indifferent sind. Bei den Alkylen steigt die bathochrome Wirkung mit zunehmendem Molekulargewicht, ebenso bei den Halogenen ($\text{CH}_3 < \text{C}_2\text{H}_5 < \text{C}_6\text{H}_5$; $\text{Cl} < \text{Br} < \text{J}$). Als hypsochrom bezeichnet *Schütze* das H, weil durch Reduktion die Farbstoffe entfärbt werden; doch ist diese Erscheinung vielleicht eher auf die Lösung der Chinondoppelbindungen zurückzuführen. Nach Obigem werden im allgemeinen analog gebaute Farbstoffe einen desto tieferen Ton aufweisen, je größer und komplizierter ihr Molekül ist. Doch auch die Stellung, die die eingeführten Gruppen (auch salzbildende) im Molekül einnehmen, kann den Farbenton beeinflussen.

Von großer Bedeutung für die praktische Beurteilung der Farbstoffe sind ihre *Löslichkeitsverhältnisse*. Die meisten Farbstoffe kommen in wässrigen Lösungen zur Anwendung, daher bei ihnen der Grad der Wasserlöslichkeit zu beachten ist. Manche Farbstoffe zeigen elektive Löslichkeit, sind z. B. wasserunlöslich und lösen sich nur in organischen Solvenzien, Fetten und fettartigen Körpern, was sie zur Fettfärbung prädisponiert. Sodann ist der Löslichkeitsgrad von gewisser Bedeutung für die Diffusibilität der Farbstoffe sowie für ihre physikalische Echtheit, d. h. für die Beharrlichkeit ihrer Haftung am gefärbten Substrat gegenüber indifferenten Lösungsmitteln.

Über den Zusammenhang zwischen *Konstitution* und *Löslichkeit* wäre folgendes zu bemerken: die Farbbasen sind entweder Ammoniumbasen (nach dem Typus $\text{NH}_4.\text{OH}$) oder Aminbasen (nach dem Typus NH_3 bzw. $\text{NH}_2.\text{R}$). Freie Ammoniumbasen sind gut wasserlöslich (Methylenblau), Basen mit nur einer Aminogruppe meist fast unlöslich in Wasser, dagegen alkohol-, äther- und fettlöslich. Solche mit mehreren Aminogruppen sind meist schwach wasserlöslich, dagegen keine Fettfarben. Die salzsauen, salpetersauen, essigsauen Salze der Farbbasen sind meist besser wasserlöslich als die Sulfate, wenig oder gar nicht die Pikrate, Tannate, Molybdate, Phosphorwolframate. Bei mehrbasischen Farbbasen werden meist einsäurige Salze gebildet und sind stabil, die mehrsäurigen labil (durch Wasser zersetzbar). Von den Farbsäuren sind Farbphenole (die nur OH-Gruppen führen: Typus R.OH) in Wasser unlöslich oder schwer löslich, ebenso Carbonsäuren Typus R.COOH , Sulfosäuren (Typus R.HSO_3) meist gut bis sehr gut wasserlöslich. Die meist gebräuchlichen Alkalisalze der Farbsäuren sind gut wasserlöslich, die Schwermetallsalze, die man als Farblacke bezeichnet, in den meisten Lösungsmitteln unlöslich. Farbsäuren können auch mehrbasische Salze liefern, die wasserbeständig sind.

Als *Echtheit* der Farbstoffe bzw. der Färbungen bezeichnet man ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber entfärbenden Einflüssen, sie ist also kein einheitlicher Begriff. Als solche Einflüsse kommen in Betracht Licht, Wasser, andere indifferente Lösungsmittel wie Alkohol, Aceton, Glycerin, Saponinlösungen, sodann differente Stoffe wie Säuren, Alkalien, Seifen, Formalin, oxydierende und reduzierende Agenzien, in der technischen Färberei noch dazu das sog. Walken, Reiben, Bügeln. Man hat hier tunlich zu unterscheiden zwischen den Echtheitsqualitäten des Farbstoffes an sich, die natürlich gegenüber den verschiedenen Faktoren verschiedene sein können, und zwischen der Echtheit des dem Substrat einverleibten Farbstoffes, die wieder je nach dem Substrat und der Art der Bindung auch für ein und denselben Farbstoff wechseln kann.

In der histologischen Färbelehre wurde unterschieden zwischen *physikalischer Echtheit* von Färbungen, also ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber indifferenten Lösungsmitteln, und *chemischer Echtheit*, also ihrer Resistenz gegenüber Agenzien, die die Verbindung von Farbstoff und Substrat chemisch zu beeinflussen vermögen (*Pappenheim*). Die erstere soll der Löslichkeit und Diffusibilität der Farbstoffe antibat sein, daher die geringe physikalische Echtheit und diffuse Färbung durch die gut wasserlöslichen und leicht diffusiblen Sulfofarbstoffe, außerdem aber soll sie bedingt werden durch die adäquate Größe des Molekularvolums der Farbstoffe einerseits, der Poren (der Intermicellarräume) der zu färbenden Substanz anderseits. Gewisse Substrate werden demnach von kleinmolekulären Farbstoffen physikalisch am echtesten angefärbt, andere von solchen mittlerer Molekulargröße, andere wieder von großmolekulären. Im letzteren Falle wird mit steigender Anzahl der in ein Chromophor eingeführten Gruppen seine physikalische Echtheit steigen, wenn es nicht etwa Sulfogruppen sind, die in entgegengesetztem Sinne wirken. Die *chemische Echtheit* wird nach *Pappenheim* vom elektrochemischen Charakter des Farbstoffes einerseits, des Substrates anderseits bedingt. Je mehr ausgesprochen der Charakter des Farbstoffes infolge der Anzahl, gleichsinnigen Ladung und Stärke der eingeführten Gruppen ist, je besser abgestimmt dieser Charakter auf die elektrochemische Ladungsgröße und Ladungssinn des Substrats, desto chemisch echtere Färbungen können resultieren.

Infolge dieser Verhältnisse kann nicht jedes Substrat direkt (*substantive Färbung*) mit jedem Farbstoff genügend echt gefärbt werden, man muß dann zur sog. *adjektiven Färbung* (*Bancroft*) greifen unter Verwendung von Hilfsstoffen, die Beizen genannt werden. Von den technischen Substraten lassen sich die tierischen Fasern Seide und Wolle von den meisten Farbstoffen mehr oder weniger echt anfärben, die pflanzliche Cellulosefaser in Form der Baumwolle ist nur mit wenigen Farbstoffen substantiv zu färben (*Baumwollfärb-*

stoffe), andere, u. zw. nicht alle, können sie nur adjektiv färben. Es gibt auch manche Farbstoffe, die nur mit Beizen verwendbar sind (obligate Beizenfarbstoffe), andere können mit und ohne Beize färben (fakultative). Als Beizen finden in der Technik Anwendung bei basischen Farbstoffen Tannin, bei sauren Metalloxyde der Schwermetalle (Kupfer, Chrom, Eisen) oder Metallsalze, die zu Oxyden reduziert werden. Es besteht also ein elektrochemischer Gegensatz zwischen Farbstoff und Beize; als Resultat ihrer Aufeinanderwirkung entstehen sehr schwer lösliche und resistente Verbindungen (sog. Farblacke bei sauren Farbstoffen). Als Träger des Farblackbildungsvermögen ist in den allermeisten Fällen die OH- oder COOH-Gruppe zu betrachten, in die das Metall substituierend eintritt. Über die Beziehungen der Beizen zum Substrat soll weiter unten die Rede sein.

Außer diesen eigentlichen Beizen werden oft noch andere Stoffe zwecks Ermöglichung oder Verstärkung von Färbungen verwendet, die man also als Beizen im weiteren Sinne (*Unno, Pappenheim*) bezeichnen kann. Hierher gehören Säuren, Alkalien (Ammoniumcarbonat, Lithiumcarbonat, Borax), Laugen, organische Basen (Anilin), Phenole, Thylen, Methylal, Jod, Brom u. a. Ihre Wirkungsweise ist nicht in allen Fällen klargestellt, zuweilen erhöhen oder erniedrigen sie die Löslichkeit der Farbstoffe, erhöhen also ihre Diffusibilität oder fördern ihre Haftung, in anderen Fällen bewirken sie chemische Veränderungen am Farbstoff (alkalische Methylenblaulösungen), vielfach scheinen sie auch das Substrat zu beeinflussen im Sinne einer besseren Zugänglichkeit für Farbstoffe. Jod und Brom geben mit manchen basischen Farbstoffen Verbindungen, die an Farblacke erinnern. Im allgemeinen können die Beizen entweder vor der Färbung angewandt werden (Vorbeizen) oder gleichzeitig mit dem Farbstoff oder erst nachträglich nach der Färbung zu ihrer Befestigung. Auch manche zur Fixation histologischer Substrate benutzten Stoffe wirken im Sinne von eigentlichen Beizen, ebenso manche Farbstoffe selbst (s. unten).

Zu erwähnen wäre noch die für histologische Färbungen bedeutungsvolle Erscheinung der Metachromasie, die darauf beruht, daß gewisse Substrate von bestimmten Farbstoffen nicht in ihrem eigentlichen Farbenton, sondern in einem abweichenden angefärbt werden. Die wichtigsten dieser Substrate sind: die Knorpelgrundsubstanz, Schleim, die Substanz der Mastzellengranula, Amyloid, Fett, die Kapselsubstanz sowie die Volutingranula der Bakterien und die Leibessubstanz der protozoischen Blutparasiten. Es sind auch nur bestimmte Farbstoffe, die metachromatisch zu färben vermögen: Methylviolett, Dahlia, Methylenblau, Azur, Toluidinblau. Thionin, Safranin, Jodgrün, Nilblau, Neumethylenblau, Indazin, Jodviolett, Amethyst, Safraninviolett, Neutralviolett, Kresylechtviolett, Brillantkresylblau,

Methylviolett, Neutralrot, Pyronin, Acridinrot sind die wichtigsten. Der Mechanismus der Metachromasie ist nicht immer ganz identisch. Beim Jodgrün scheint die Ursache in einer Verunreinigung mit Methylviolett zu liegen. Bei anderen Farbstoffen sollen nach *Pappenheim* stark basophile, d. h. stark saure Substrate die anders gefärbte Farbbase freimachen und an sich reißen (es kommt aber doch nicht zur Salzbildung!).

Nach *L. Michaelis* sind die metachromatischen Farbstoffe in den metachromatisch gefärbten Substraten in einer tautomeren anders gefärbten Modifikation enthalten, die durch intramolekuläre Umlagerung der Säuregruppe aus dem normalen Farbstoff leicht entstehen und ebenso leicht in ihn sich zurückverwandeln kann. Als bekannte Analogie wäre das Beispiel des Jods zu zitieren, das in Wasser gelb, in Chloroform violett gefärbt ist, Gewebe gelb, Amyloid und Glykogen braun, Stärke und Granulose blau (eventuell rot) färbt. Ebenso löst sich nach *Michaelis* die Nilblaubase in Benzol, Toluol, Äther, Paraffin, Chloroform und CS_2 mit roter Farbe, in Alkoholen, geschmolzenem Harnstoff sowie Cellulose mit blauer, ohne daß in den letzteren Lösungsmitteln Salzbildung in Betracht käme. Nach *Eisenberg* endlich sollen die metachromatischen Farbstoffe hydrolytisch gespalten sein und die freien anders gefärbten Basen von den entsprechenden Substraten rein physikalisch durch Lösung gespeichert werden (ebenso *Pappenheim*). Daß bei Vitalfärbungen Metachromasie zuweilen der Ausdruck rein kolloidchemischer Zustandsänderung des Farbstoffs sein kann, haben neueste Versuche von *Schulemann* gezeigt.

Außer den bisher beschriebenen Färbungen, die in Lösungen der fertigen Farbstoffe vorgenommen werden, kann man auch die Farbstoffe erst auf dem Substrat entwickeln. Eine Abart dieser Färbungsweise ist die in Form der Indigofärberei bekannte *K ü p e n f ä r b u n g*. Diese beruht darauf, daß das Substrat im Bade der reduzierten Leukoverbindung des Farbstoffes (Küpe) mit dieser imprägniert wird, und dann erst durch Oxydation an der Luft auf dem imprägnierten Substrat der eigentliche Farbstoff entwickelt wird. Eigentliche *Entwicklungsfärbungen* sind solche, wo ein Substrat mit einem Stoff imprägniert und dieser dann durch entsprechende weitere chemische Behandlung auf dem Substrat zum Farbstoff umgewandelt wird. So werden Fasern mit Anilinsalzen imbibiert und diese dann durch oxydierende Mittel in sog. Anilinschwarz umgewandelt. Oder man imprägniert sie mit Phenolen. Aminen u. dgl., um diese dann auf der Faser zu Azofarbstoffen zu diazotieren.

B. Theorien des Färbprozesses.

Bei der großen praktischen sowohl als theoretischen Bedeutung der Färbvorgänge wird es wohl nicht verwunderlich erscheinen, daß seit langer Zeit von verschiedenen Forschern Versuche gemacht wurden, diese Vorgänge durch Anreihung an andere besser erforschte dem

Verständnis näherzubringen. Die diesem Bestreben entsprungenen vielen Theorien suchten meist Anlehnung an physikalische oder chemische Vorgänge zu finden; in neuester Zeit hat die Betrachtungsweise der rasch sich entwickelnden Kolloidchemie auch auf diesem Gebiete durchschlagende Erfolge zu verzeichnen.

Daß eine endgültige Einigung über diese Fragen bis jetzt noch nicht erfolgt ist, rechtfertigt sich durch die Schwierigkeiten, die die komplizierte Struktur der Farbstoffe, noch mehr aber die mangelhafte Kenntnis der zu färbenden organischen Substrate der Aufklärung ihrer Reaktionen entgegensetzen. In der technischen Färberei gestalten sich die Probleme relativ einfacher, weil hier meist nur drei verschiedene Substrate — Seide, Wolle und Baumwolle — in Frage kommen, während die biologischen Zwecken dienende Färbung eine große Mannigfaltigkeit verschiedener, zum Teil nur morphologisch oder physikalisch charakterisierter Substrate vor sich hat. Mit Rücksicht auf die Verschiedenheit der Substrate, zum Teil auch, weil die biologische Färbung auf die möglichst essentielle, chemische Differenzierung der Substrate losgeht, waren die Histologen meist Vertreter der chemischen Richtung, während die Technologen mehr zu physikalischen Erklärungsversuchen neigen. Die Lücken, die alle diese Theorien unzweifelhaft offen lassen, erklären es wohl auch, daß mehrfach Kombinationen der Theorien herangezogen wurden, so der chemischen und physikalischen, der kolloidchemischen und chemischen oder auch aller zusammen. Ihre Berechtigung finden diese Kombinationsversuche in der Erkenntnis, daß die Färbung kein einheitlicher, in allen Fällen identischer Vorgang sein dürfte, sondern daß sowohl Färbungen ein und desselben Substrats durch verschiedene Farbstoffe, als auch Färbungen verschiedener Substrate mit ein und demselben Farbstoff untereinander differente Vorgänge sein können. Das eine Mal können physikalische, das andere Mal (elektro)chemische, das dritte Mal vielleicht kolloidchemische Faktoren im Vordergrund stehen. Die histologische Fettfärbung mittels Scharlach R, Sudan III oder Nilblau ist wohl als rein physikalischer Lösungsvorgang aufzufassen, die substantive Baumwollfärbung mit Benzidinfarbstoffen als Adsorptionsvorgang, Färbungen mit Farbsäuren oder Farbbasen, die den Ton der Farbsalze ergeben, lassen chemische Vorgänge annehmen.

Die chemischen Theorien haben ebenso wie alle anderen zum Ausgangspunkt die Beobachtung, daß gefärbten Substraten in vielen Fällen auch durch intensives Auswaschen mit indifferenten Lösungsmitteln nur ein Teil des Farbstoffes entzogen werden kann, daß also neben diesem nur locker gebundenen Anteil ein fest fixierter vorhanden sein muß. Während für den ersten physikalische Bindung gegeben wird (Adhäsion), soll der zweite in Form eines Salzes im Gewebe fixiert sein. Da nun die meisten Farbstoffe Salze von Farbbasen oder Farbsäuren sind, müssen dieselben durch die chemischen Affini-

täten des Substrats gespalten werden, und es reagieren dann die freien Farbbasen oder Farbsäuren mit entgegengesetzt geladenen Bestandteilen der Substrate unter Salzbildung. Ebenso wie am Eiweiß der Gewebe wird an den tierischen Fasern (Wolle, Seide) das Vorhandensein basischer bzw. saurer ($\text{NH}_2\text{—COOH}$)-Gruppen angenommen, die zur Salzbildung befähigt sind. Nach der chemischen Theorie ließen sich also folgende allgemeine Formeln für die Färbung mit basischen bzw. sauren Farbstoffen aufstellen:

Salzsaure Farbbase + Gewebe (Faser) = gewebssaure Farbbase + NaCl.

Farbsaures Na + Gewebe (Faser) = farbsaure Gewebsbase + NaCl. Zu den hauptsächlichen Stützen der chemischen Theorie gehört die Feststellung von *Jacquemin*, daß Wolle und Seide in einer erwärmten farblosen Lösung der Rosanilinbase sich tief rot färben, also im Ton der Rosanilinsalze (Fuchsin). Noch mehr schien diese Annahme einer Salzbildung bekräftigt durch die Versuche von *Knecht*, der fand, daß beim Färben tierischer Fasern mit basischen Farbstoffen die mit dem Farbstoff verbundene Säure nach der Färbung ganz im Farbbad in Form von Neutralsalz zurückbleibt, wie es die oben angeführte Formel erfordert.

Die chemische Theorie postuliert, wie wir sehen, elektrochemische Gegensätze zwischen Farbstoff und Substrat; je stärker ausgesprochen der elektrochemische Charakter eines Farbstoffes ist, desto stärker muß auch die Gewebssäure oder Gewebsbase sein, um das Farbstoffsalz spalten und das färbende Prinzip an sich reißen zu können. So kann z. B. ein nur schwach basisches Substrat mit stark sauren Farbstoffen nicht färbbar sein, weil es die Farbsäure nicht freizumachen vermag. Die verstärkende Wirkung von Alkalien auf die Färbung mit basischen Farbstoffen, diejenige von Säuren auf saure erklärt die chemische Theorie durch erleichterte Zersetzung der Farbsalze (wobei freilich nicht einzusehen ist, weshalb die zugesetzte Base oder Säure nicht eher mit der Gewebssäure oder Gewebsbase reagiert). Entsprechend dieser Auffassung unterscheidet die chemische Theorie der histologischen Färbung, als deren hervorragendste Vertreter *Ehrlich*, *Griesbach*, *Unna*, *Heidenhain*, zum Teil auch *Pappenheim* genannt seien, acidophile, basophile und neutrophile Substrate. Die ersten haben basischen, die zweiten sauren Charakter, die dritten sind befähigt, neutrale Farbstoffe, d. h. farbsaure Salze von Farbbasen zu binden, was freilich die chemische Theorie nicht zu erklären vermag. Darüber, welche Art von Farbstoffaffinität vorliegt, sollen Färbungen mit neutralen Farbstoffen belehren, acidophile und basophile Substrate spalten dieselben und nehmen ihnen den ihnen adäquaten Bestandteil, neutrophile fixieren die unzersetzte komplexe Verbindung als solche. Acido- und Basophilie kommen in verschiedenen Abstufungen vor, und differentielle Färbungen mit Gemischen von Farbstoffen desselben Charakters, aber von verschiedener Stärke der Acidität bzw. Basizität sollen die Bemessung des

elektrochemischen Charakters von Gewebsbestandteilen ermöglichen. Nach *Lillie*, *Pentimalli* und *Mc Clendon* sollen chromatinreiche Zellen anodische, chromatinarme kathodische Konvektion zeigen, was mit der Basophilie des Chromatins und Acidophilie des Plasmas gut übereinstimmt. Die entfärbende Wirkung von Säuren bzw. Basen wird durch Sprengung der Farbstoffverbindungen oder durch Bildung leicht löslicher mehrsauriger oder mehrbasischer Salze erklärt, die herausgewaschen werden. Viele histologische Substrate (auch Bakterien siehe weiter unten) sind amphophil, d. h. vermögen sowohl basische als saure Farbstoffe zu binden, meist jedoch mit Überwiegen der acido- oder basophilen Komponente. Wo die natürliche Affinität des Substrats zu schwach ist, um einen gegebenen Farbstoff zu zersetzen und zu binden, oder wo sie überhaupt fehlt, setzt die Beize mit ihrer ausgesprochenen Affinität für den Farbstoff helfend ein, die saure für basische Farbstoffe, die basische für saure, sie ersetzt also fehlende Affinitäten oder steigert vorhandene, aber ungenügende. Die Bindungsweise der Beize soll eine amboceptorartige sein, indem sie einerseits an das Substrat herantritt, anderseits durch „haptophore“ Gruppen den Farbstoff an sich kettet, woraus eine Tripelverbindung resultieren soll.

Als weitere Beweise für die Richtigkeit der chemischen Theorie werden außer den oben erwähnten Versuchen von *Jacquemin* sowie *Knecht* noch Untersuchungen von *Suida* angeführt über Spaltprodukte von Wolle (Lanuginsäure) sowie von Eiweiß, die tatsächlich salzbildungsfähig sind. Sodann haben Untersuchungen an unlöslichen amorphen anorganischen und organischen Substanzen (Silicate und andere Salze, Stärke, Tierkohle) meist ergeben, daß basische Substanzen meist nur mit sauren, saure mit basischen Farbstoffen sich anfärben (*Suida*, *Heidenhain*, *Vignon* u. a.). In demselben Sinne sprechen die Versuche *Beckholds* mit Suspensionen chemisch definierter Substanzen: das indifferente Naphthalin wurde von basischen und sauren Farbstoffen gar nicht oder nur schwach und unecht angefärbt; das saure Naphthol von sauren schwach oder gar nicht, gut von basischen, das basische Naphthylamin umgekehrt gut von sauren, schlecht oder gar nicht von basischen, das amphotere Amidonaphthol sowohl von basischen als auch von sauren Farbstoffen. Anstatt solche fernerliegenden Modelle von Substraten zu suchen, haben *Matthews* sowie nach ihm *Heidenhain* direkt Eiweißlösungen zu Färbungsversuchen herangezogen und gefunden, daß alkalisch gemachte Lösungen mit basischen, angesäuerte mit sauren Farbstoffen gefärbte Niederschläge geben. Diese Reaktion überträgt *Heidenhain* auf die Färbung, nur soll hier meist die Eiweiß-Farbstoff-Verbindung nicht ausgefällt werden, sondern in Lösung bleiben (s. auch *Robertson*).

Eine von der hier skizzierten abweichende Form der chemischen Theorie vertritt *Unna*. Nach ihm sind die histologischen Färbungen zwar chemische Prozesse, aber nicht nach der Art der gewöhnlichen

Salzbildungen, sondern eher eine Art von Doppelsalzbildungen zwischen den Farbsalzen und Gewebselementen. Durch diese Annahme wird zwar dem Vorhandensein bestimmter chemischer Affinitäten zwischen Farbstoffen und Substraten sowie Beizen Rechnung getragen, anderseits aber wird das Bestehen fester stöchiometrischer Beziehungen bei diesen Verbindungen negiert. Es sollen vielmehr Farbstoffe mit den Gewebselementen, ebenso mit Beizen und manchen Entfärbern variable Molekülkomplexe bilden, die keine obere Sättigungsgrenze ergeben. Auch Ehrlich hat übrigens die Färbung als „atypische Doppelsalzbildung“ bezeichnet, und in neuester Zeit haben Pfeiffer u. Wittka gefunden, daß Aminosäuren sowie Polypeptide mit Farbstoffen typische Farbsalze bilden, die sie den Neutralsalz-Additionsverbindungen der Aminosäuren und Polypeptide (von Pfeiffer u. Modelski) an die Seite stellen.

In neuester Zeit hat nun Unna diese Anschauungen erweitert durch Berücksichtigung der Beziehungen, die Farbstoffe und Beizen einerseits, Gewebselemente anderseits zum Sauerstoff aufweisen. Nachdem er mittels geeigneter Reaktionen in den Geweben „Sauerstofforte“ mit oxydativen und „Reduktionsorte“ mit reduzierenden Tendenzen nachgewiesen hat, zeigt er weiter, daß auch das Verhalten von Farbstoffen und Beizen gegenüber dem Sauerstoff für die Färberei sehr wichtig sein kann. Es gibt sehr reduktionsempfindliche Farbstoffe (vor allem das durch hohe Spezifität ausgezeichnete Methylgrün — der „Kernfarbstoff par excellence“), die nur an Sauerstofforten zur Geltung kommen, anderseits übt die Mehrzahl der histologischen Beizen oxydative Funktionen aus, wodurch die Reduktionsgefahr (die zur Entfärbung führen kann) für empfindliche Farbstoffe herabgesetzt wird. Unna nimmt nun an, daß zwischen oxydierenden und reduzierenden Substanzen — den „Polen der Sauerstoffskala“ — eine besondere von der elektrochemischen verschiedene Affinität besteht, so daß oxydierende Agenzien das Bestreben haben, sich an reduzierenden zu fixieren und umgekehrt. Diese „oxypolare Affinität“ soll nun neben der elektrochemischen in hohem Grade an der Bindung von Farbstoffen an Gewebe sowie an Beizen beteiligt sein, in der histologischen Färberei soll ihre Bedeutung sogar derjenigen der elektrochemischen Affinität vorangehen. Diese neuere Unnasche Theorie wird freilich in neuester Zeit von manchen Autoren (Oelze, Schneider) bekämpft.

Es ist nicht zu verkennen, daß die chemische Theorie der Kritik manchen Angriffspunkt bietet. Abgesehen davon, daß viele der angeführten Beweise auch anderer Deutung zugänglich sind, gibt es Tatsachen in der Färberei, die sich damit überhaupt nicht in Einklang bringen lassen. Die wichtigste ist die substantive Färbung von Baumwolle oder Papier (Cellulose) mit verschiedenen Farbstoffen. Bei diesem sehr wenig reaktionsfähigen Stoff ist an eine Salzbildung nicht zu

denken. Ebensovienig vermag die chemische Theorie die Färbung mancher Substrate mit neutralen Farbstoffen zu erklären, die unter gewöhnlichen Umständen keiner Salzbildung fähig sind. Schwer fällt es auch, auf Grund der chemischen Theorie die teilweise Entfärbung vieler Färbungen mittels indifferenten Lösungsmittel zu erklären; man müßte wohl einen spaltenden Einfluß von Wasser oder Alkohol auf die Farbstoffverbindung annehmen, ausgewaschen wird aber nachgewiesenermaßen das Farbsalz, nicht aber die Farbbase oder die Farbsäure. Daß die Erklärung der fördernden Wirkung von Säure oder Alkali auf Färbungen mit sauren bzw. basischen Farbstoffen unbefriedigend ist, habe ich schon oben angedeutet. Auch kann es keinem Zweifel unterliegen, daß die Fettfärbung mit indifferenten Farbstoffen einen rein physikalischen Vorgang darstellt, der nichts mit Salzbildung zu tun hat. Ein wichtiges Postulat endlich, das sich aus der chemischen Theorie ergibt, ist bis jetzt nicht erfüllt worden, nämlich der Nachweis stöchiometrischer Beziehungen zwischen Farbstoff und Substrat, während die vorliegenden quantitativen Untersuchungen für eine andere Auffassung, die Absorptionstheorie sprechen. Wenn nun die Anhänger der chemischen Theorie, um die Situation zu retten, behaupten, das Gesetz der konstanten Proportionen finde hier keine Anwendung, es seien eben Verbindungen in wechselnden Proportionen oder Doppelsalzbildungen (*Unna*), ebenso wenn sie neben der chemischen Bindung eine physikalische annehmen, oder diese jedenfalls der chemischen vorausgehen lassen, so geben sie damit zu, daß ihre Theorie nur einen Teil der Beobachtungstatsachen zu erklären vermag und auch diesen nicht immer in befriedigender Weise.

Sehen wir nun zu, was uns die physikalischen Theorien an Stelle der chemischen Erklärung zu bieten haben. Die älteren physikalischen Theorien, die bis auf das Ende des 18. Jahrhunderts zurückreichen (*Haley* 1786), gehen meist von der Analogie der Färbung mit der Aufnahme von Farb- oder Riechstoffen seitens poröser Stoffe (Holz, Tierkohle u. dgl.) aus. Durch Diffusion (unterstützt vom osmotischen Druck) gelangen die Farbstoffteilchen in das Substrat und werden hier innerhalb der „Intermicellarräume“ durch „Molekularattraktion“ festgehalten. Vorbedingung einer echten Färbung soll eine räumliche Harmonie zwischen der Größe des Farbstoffmoleküls und derjenigen der Intermicellarräume sein; ist das Farbstoffmolekül zu groß, so kann es nicht herein, ist es zu klein, so haftet es nicht, und wird leicht herausdiffundieren. Linksspektrale, helle Farbstoffe von meist kleinerem Molekularvolumen sollen also am besten für engporiges, rechtsspektrale dunkle mit großem Molekül für weitporiges Material passen. Auf diese Auffassung stützt sich die seinerzeit viel diskutierte Lehre von *Auerbach*, wonach Differentialfärbungen mit Farbstoffen verschiedener Nuancen berufen sein sollen, über die physikalische Struktur von Gewebsbestandteilen Aufschluß zu geben. Engporige sollen „xanthophil“

sein, d. h. elektive Affinität für gelbe Farbstoffe bekunden, mittelporige „erythrophil“ (für rote), weitporige „cyanophil“ (für blaue oder violette).

Wenn wir von den ihrer Natur nach schwer kontrollierbaren Spekulationen über „Metastrukturen“ absehen, so läßt sich eine gewisse Berechtigung der Anschauung nicht absprechen, daß zwischen physikalischem Zustand des Substrates und des Farbstoffes gewisse Beziehungen existieren, die im Färbungsergebnis zum Ausdruck kommen. Von *Ehrlich* ist gezeigt worden, daß mit der durch verschieden hohes Erhitzen bedingten Abdichtung der roten Blutkörperchen eine Verschiebung der färberischen Affinitäten in obenerwähntem Sinne (von Dunkel zu Hell) einhergeht. *Beckhold* hat an Filtrierpapierstreifen, die mit verschieden konzentriertem Kollodium getränkt waren, gezeigt, daß zwischen Dichte des Substrats und der Teilchengröße (nicht aber der Nuance) der Farbstoffe Beziehungen bestehen, die das Färbungsergebnis beeinflussen. Leicht diffundierende, kleinemolekuläre Farbstoffe färben umso intensiver, je dichter das Substrat, schwer diffundierende großmolekuläre (hochkolloide) umso schlechter, solche von mittlerer Teilchengröße färben verschieden dichte Substrate fast gleich stark. Die Schnelligkeit der Färbung wird von der Diffusibilität der Farbstoffe bedingt, anderseits aber (*Knoevenagel*, *Eberstadt*) auch vom Quellungs- und Zustand des Substrats und geht mit beiden Faktoren symbat. Es wäre aber zu weit gegangen mit *Auerbach* anzunehmen, daß die physikalische Struktur der Substrate der einzig maßgebende Faktor der elektiven Farbstoffaffinität ist, und *Pappenheim* hat in einer eingehenden Analyse nachgewiesen, daß auch das elektrochemische Verhalten der Substrate einerseits, der Farbstoffe anderseits hieran in hervorragendem Maße beteiligt ist.

Über die physikalischen Kräfte, die die Haftung der Farbstoffe am Substrat besorgen, hat *Witt* (1890) in seiner Lösungstheorie Aufschluß bringen wollen. Die Bindung soll nach ihm durch „starre Lösung“ erfolgen, wie sie etwa in den gefärbten Gläsern oder den kohlenstoffhaltigen Eisensorten vorliegt. Als Stütze für seine Auffassung betrachtet *Witt* die Tatsache, daß gefärbte Fasern nicht die Eigenschaften der Farben in Substanz aufweisen, sondern diejenigen von Farbstofflösungen; mit Fuchsin gefärbte zeigen also keinen Metallglanz, sondern rote Färbung, mit Rhodamin gefärbte fluorescieren, wie die Lösungen dieses Farbstoffes, was bei der Substanz vermißt wird. Die Aufnahme der Farbstoffe soll als Lösungsvorgang etwa der Ausschüttlung von Farbstoffen aus schlechteren Lösungsmitteln durch bessere analog erfolgen als Ausdruck der höheren Löslichkeit des Farbstoffes im Substrat als im Medium (der Farbflotte). Es ist jedoch der Lösungstheorie nicht gelungen, die elektiven Affinitäten verschiedener Substrate für verschiedene Farbstoffe restlos zu erklären, vor allem aber haben quantitative Untersuchungen über die Farbstoffaufnahme Resultate ergeben,

die mit den Postulaten der Lösungstheorie nicht übereinstimmen, da sie dem *Henryschen* Verteilungssatz nicht entsprechen. Man muß demnach diese Theorie als den Tatsachen nicht entsprechend ablehnen.

In neuerer Zeit hat nun die physikalische Theorie in abgeänderter Form, u. zw. als sog. Adsorptionstheorie von neuem eine Deutung der Färbvorgänge unternommen und man kann sagen, daß diese jetzt das Feld beherrscht. Hatte man schon früher die Färbung mit der Fixierung verschiedener Farb- und Riechstoffe durch Kohle, Holz u. a. feine Suspensionen verglichen, so konnte man jetzt, da diese Vorgänge durch *van Bemmelen*, *Freundlich* u. a. genauer untersucht und in ihrer Gesetzmäßigkeit erkannt wurden, den Vergleich weiter ausbauen. Tatsächlich zeigten die Untersuchungen von *v. Georgievics*, *Walker* u. *Appleyard*, *Schmidt*, *Bütz*, *Freundlich* u. *Losev* an einer Reihe von Standardfällen, daß die quantitativen Bindungsverhältnisse bei einer Reihe typischer Färbungen Kurven ergeben, wie sie für Adsorptionsvorgänge charakteristisch sind (Adsorptionsisothermen). Diese Auffassung erklärt wohl am besten die bei allen Färbungen wiederkehrende Beobachtung, daß aus stark verdünnten Farblösungen relativ mehr Farbstoff fixiert wird, als aus konzentrierteren, was eben aus dem für Adsorptionsvorgänge gültigen Verteilungssatz direkt folgt. Die treibende Kraft bei den Adsorptionsvorgängen sind Oberflächenkräfte, und diese finden sich am ausgesprochensten an dispersen Systemen (Dispersoiden) mit großer Oberflächenentfaltung oder sog. Kolloiden. Es unterliegt nun keinem Zweifel, daß sowohl die technologischen als auch die histologischen Färbesubstrate Kolloide sind (*Müller-Jacobs*, *Zacharias*, *Freundlich*), deren Sol- bzw. Gelzustand durch verschiedene Einwirkungen (Beizen und andere Zusätze zu den Farbbädern) beeinflusst werden kann. Die dadurch bedingten Quellungs- und Entquellungs Vorgänge sowie Änderungen der Dispersion sind dann ihrerseits von großer Bedeutung für den Charakter und die Intensität der Adsorption. Andererseits sind die Farbstoffe, obwohl sie wie die anorganischen Farbsalze in ihren Lösungen elektrolytisch dissoziiert sind und ziemlich hohe Leitfähigkeit aufweisen, z. T. auch Semikolloide oder Kolloide und weisen dementsprechend besonders in konzentrierteren Lösungen Neigung zur Aggregation von Teilchen (Flockungen) auf, wie echte Kolloide (s. z. B. die stalagmometrischen Untersuchungen von *Traube*). Echte Lösungen bilden z. B. Pikrinsäure, Methylenblau, Malachitgrün, Auramin, Chrysoidin, Vesuvin, Fluorescein, Eosin, Alizarinrot; Halbkolloidlösungen Methylviolett, Krystallviolett, Capriblau, Nilblau, Neutralrot, Rhodamin; Kolloidlösungen Fuchsin, Nachtblau, Alkaliblau, Azoblau, Kongorot, Benzopurpurin und andere Baumwollfarbstoffe. Es ist klar, daß der kolloide Charakter vieler Farblösungen ihre Adsorption begünstigt, besonders aber dann, wenn durch Zusätze zum Farbbad Aggregationen von Farbstoffmolekülen bedingt werden, wie das z. B.

bei basischen Farbstoffen durch Alkalizusätze in Form der sog. „Schwebefällung“ (*Unna*) erfolgt.

Gewisse Schwierigkeiten scheinen auf den ersten Blick der Adsorptionstheorie zwei grundlegende Tatsachen zu bereiten, mit denen jede Färbungstheorie rechnen muß. Die eine ist die mehr oder weniger weitgehende Echtheit, die ja eine essentielle Bedingung jeder guten Färbung ist. Sie spricht dafür, daß die Färbungen zum Teil wenigstens irreversible Vorgänge sind, während die Adsorption im Prinzip wenigstens reversibel ist. Um diese Irreversibilität zu erklären, muß man annehmen, daß der durch Adsorption im Substrat konzentrierte semikolloide oder kolloide Farbstoff eine Herabsetzung der Dispersion oder sog. Hysteresis erfährt, wie sie bei vielen Kolloiden beobachtet wird (Häutchenbildungen, Niederschläge), und dadurch unlöslich wird. Oder aber man nimmt eine chemische oder Adsorptionsverbindung zwischen Farbstoff und Fasersubstanz oder anderen von der Faser adsorbierten Stoffen (Beizen) an, die unlöslich oder nicht diffusibel ist (*Freundlich* u. *Losev*). Es bietet sich hier die Möglichkeit, die kolloidchemisch-physikalische Theorie mit der chemischen zu verbinden, indem man annimmt, daß in allen Fällen die Aufnahme der Farbstoffe durch Adsorption erfolgt (ausgenommen etwa die durch Lösung erfolgenden Fettfärbungen), in manchen aber chemische Reaktionen zwischen Farbstoff und Substrat der Aufnahme nachfolgen.

Die zweite Schwierigkeit für eine restlose Erklärung der Färbungsvorgänge auf Grund der Adsorptionstheorie liegt in der durch den oben schon erwähnten *Knechtschen* Versuch bewiesenen Spaltung der basischen Farbstoffsalze und elektiven Adsorption des färbenden Ions (Farbbase), während das Anion in Lösung zurückbleibt als Säure oder Salz. Man wäre natürlich nicht leicht geneigt, durch physikalische Kräfte derartige Spaltungen sich bewirkt zu denken; hier entscheidet aber vor allem die Beobachtung, daß bei verschiedenen Adsorptionen sowohl anorganische als auch organische Salze gespalten werden können und daß dann eine ungleichmäßige Adsorption der beiden Ionenarten erfolgen kann (*van Bemmelen*, *Masius*, *Michaelis*). Bei Farbsalzen erfolgt das nicht nur bei Kontakt mit Fasern und Gewebe, sondern auch mit anorganischen Substraten (Kohle, Silicate), die die Annahme chemischer Umsetzungen als wenig wahrscheinlich erscheinen lassen. *Freundlich* u. *Losev* sowie *Pelet-Jolivet* erklären diese Erscheinung auf Grund der Lehre von der Kontaktelektrizität in folgender Weise: die Kohle oder Faser ist in indifferentem Medium von einer Doppelschicht von Ionen umgeben, die innere Schicht bilden —OH-Ionen, die äußere +H-Ionen, ihre Ladung ist meist schwach negativ. Der basische Farbstoff dissoziiert in der Lösung in die positiven Farbstoffkationen und die negativen anorganischen Anionen (z. B. —Cl). Die beiden Ionenarten sind disparat, d. h. von verschiedener Größe, das kleinere anorganische ist beweglicher und wirksamer und verstärkt dadurch die negative Ladung

des Substrats, das befähigt wird das Farbstoffkation anzuziehen. Dieses verbindet sich mit dem Hydroxylion zur Farbstoffbase und fixiert sich auf dem Substrat eventuell unter Kondensation, das Anion verbindet sich mit dem H-Ion und bleibt als Säure in der Lösung. Bei der Färbung mit sauren Farbstoffen soll das an das Farbstoffanion gebundene anorganische Kation (etwa $+K$) die negative Ladung des Substrats in eine positive umwandeln, wodurch die Fixation des Farbstoffanions ermöglicht wird. Merkwürdigerweise wird das Farbstoffmolekül dabei nicht gespalten, sondern wird als ganzes gebunden. Diese Anschauung geht also darauf hinaus, daß die Farbstoffanionen an das durch die sie begleitenden anorganischen Ionen sozusagen gebeizte Substrat vermittels elektrischer Kräfte gebunden werden.

Die die Färbung begünstigenden Zusätze von Säuren bzw. Alkalien werden nach dieser Anschauung dadurch wirksam, daß sie dem Substrat eine elektrische Ladung erteilen oder eine vorhandene erhöhen, so daß es nun intensiv das Farbstoffion (oder Molekül) binden kann. Durch Säuren wird das Substrat positiviert und kann nun Farbstoffanionen fixieren, durch Basen wird es negativiert und zur Bindung von Farbstoffkationen befähigt. Es ist offenkundig, daß die von der chemischen Theorie stark betonten Gegensätze der elektrischen Ladung von Farbstoff und Substrat auch im Sinne der hier entwickelten Anschauung als färbungsbegünstigende Faktoren ihre Geltung behalten, indem sie die Anziehung des färbenden Agens bzw. die Ausflockung gefärbter Komplexe ermöglichen oder verstärken.

Die eigentlichen Beizen werden, wie sich gezeigt hat, ebenfalls durch Adsorption an das Substrat gebunden. Die weitere Bindung der Farbstoffe an das gebeizte Substrat scheint entweder ebenfalls auf Adsorption zu beruhen, oder aber es tritt in manchen Fällen eine chemische Umsetzung ein mit Bildung eines Metallsalzes der Farbsäure oder eines Farbbäsentannats.

Wie wir gesehen haben, schließt die Annahme der physikalischen Adsorptionstheorie die Anerkennung gewisser, der Adsorption folgender chemischer Umsetzungen nicht aus, auch wird von ihren Anhängern anerkannt, daß die chemische Konstitution der Farbstoffe sowohl als der Substrate sowie die dadurch bedingten elektrochemischen Eigenschaften ihre Adsorptionsfähigkeiten bzw. ihre Adsorbierbarkeit in hohem Grade beeinflussen. Umgekehrt haben schon früher Anhänger der chemischen Theorie physikalischen Faktoren (Berücksichtigung der Molekülgröße der Farbstoffe und der Intermicellarspatien der Substrate, Annahme von Oberflächenattraktion) einen ziemlich großen Einfluß auf die Färbungsvorgänge zuerkannt und so eine Annäherung beider Richtungen angebahnt (*Pappenheim, L. Michaelis*). Ihre damals noch wenig präzisierten Anschauungen in

dieser Hinsicht haben seither in der Adsorptionstheorie einen vielversprechenden Ausbau gefunden, und es ist zu hoffen, daß es gelingen wird, auf diesem Wege zu einer endgültigen Einigung über die Färbungstheorie zu gelangen.

Zu erwähnen wäre noch die in neuester Zeit aufgestellte Sorptionstheorie, eine physikalische Theorie, die von ihrem Autor *v. Georgievics* auch zur Erklärung der Färbungsvorgänge herangezogen wurde. Als „Sorption“ wird hier jegliche Aufnahme eines Stoffes durch einen anderen bezeichnet und zu ihrer Charakterisierung die *Bödecker*-sche Adsorptionsformel $\sqrt[x]{\frac{C\text{-Flotte}}{C\text{-Faser}}} = K$ herangezogen (C-Flotte = Konzentration des sorbierten Stoffes in der Lösung, C-Faser = diejenige in der Faser bzw. in der sorbierenden Substanz, K = Sorptionskonstante). Bei $x=1$ haben wir einen Lösungsvorgang nach dem Verteilungssatz vor uns, bei $x>1$ einen Adsorptionsvorgang, u. zw. ist die Adsorption umso stärker, je größer x ist. Diese Theorie würde es also ermöglichen, Lösungs- bzw. Verteilungsvorgänge, auf denen z. B. die Fettfärbung beruht, zusammen mit den Adsorptionsvorgängen, die bei der Mehrzahl der Färbungen in Betracht kommen, unter einem gemeinsamen Gesichtspunkt zu behandeln, und sieht auch Übergänge zu chemischen Verbindungen vor.

C. Allgemeines über Färbungsmethoden und die Beurteilung ihrer Resultate.

Die technologische und die histologische Färbung unterscheiden sich voneinander prinzipiell in bezug auf den Endzweck, den sie verfolgen. Während die Technologie möglichst gleichmäßige („egalisierte“) und dabei nach verschiedenen Richtungen möglichst echte Färbungsergebnisse anstrebt, geht die Histologie auf möglichst differenzierte Färbungen aus, was zum großen Teil dank der verschiedenen Echtheit derselben erreicht werden kann.

Die histologische Färbung verfolgt, wie oben schon angedeutet wurde, zunächst morphologische Zwecke, sie sucht also möglichst viele Differenzen an ihren Substraten auszuarbeiten und anschaulich darzustellen. Das ist möglich entweder, indem verschiedene Anteile der Bilder in derselben Farbe, aber verschieden in ihrer Färbungsintensität abgetönt erscheinen, oder indem sie in verschiedenen Farben dargestellt werden. Damit ist aber die Aufgabe oder wenigstens das Bestreben des histologischen Färbers nicht erschöpft, er will vor allem wissen, ob die Bilder, die ihm die Färbungen oft in bunter Farbenpracht liefern, auch präexistierenden Realitäten entsprechen, vor allem ob sie getreue Abbildungen vitaler Verhältnisse liefern. Sodann aber ist es sein Bestreben, etwas über die wesentlichen biophysikalischen und biochemischen Differenzen zu erfahren, die den Färbungsdifferenzen zugrunde liegen, ein Bestreben, dem, wie wir sehen werden, nur sehr bescheidene Erfolge bis jetzt zuteil wurden. Endlich versucht er durch parallele physio-

logisch-experimentelle und histologische Beobachtung den Aufbau der Lebewesen nicht nur nach seiner statischen, strukturellen, sondern auch nach seiner dynamischen, funktionellen Seite zu erforschen, indem er die Veränderungen studiert, die die morphologischen Elemente während ihrer Funktionen erleiden.

Was die „Lebenstreue“ der beobachteten Bilder anbelangt, muß man sich vor Augen halten, daß schon das Absterben der Objekte gewisse Veränderungen an den Strukturen bedingen kann, deren Erkennung und Beurteilung umso mehr Schwierigkeiten bereitet, als die Beobachtung von lebenden oder überlebenden Objekten ein nur mangelhaftes Vergleichssubstrat bildet. Die meisten Objekte müssen sodann, um überhaupt gefärbt werden zu können, noch fixiert werden, d. h. auf einen die Färbung ermöglichenden Entquellungszustand gebracht werden. Die dazu gebräuchlichen Prozeduren sind aber nicht immer in bezug auf die Lebenstreue der Bilder als indifferent zu betrachten. Es sind dies meist eiweißkoagulierende Stoffe, zum mindesten aber Agenzien, die den Kolloidzustand der zu färbenden Substrate eingreifend beeinflussen; nur ihre sehr behutsame und verständnisvolle Anwendung kann vor groben Fehlern und Mißdeutungen bewahren. Aus den Untersuchungen von *A. Fischer*, *W. Berg* sowie *v. Wasielewski* ist bekannt, daß durch Fixatoren in eiweißhaltigen amorphen Medien Granula, Gerinnsel, Vakuolen u. dgl. entstehen können, die man dann leicht als präformiert ansprechen kann. Auch physikalische Fixationsmethoden können ebenso wie chemische durch Schrumpfungs- und Quellungsvorgänge Artefakte erzeugen, so z. B. das in der alltäglichen Bakteriologie meistgeübte Fixieren in der Flamme.

Um am fixierten Objekt möglichst viele Bestandteile in differenter Färbungsintensität oder -Qualität darzustellen, stehen uns verschiedene Färbungsmethoden zu Gebote. Dieselben wurden in Anlehnung an die bahnbrechenden Untersuchungen von *Ehrlich* sowie von *Auerbach* und von *Pappenheim* in sehr zweckmäßiger Weise nach folgenden Gesichtspunkten eingeteilt:

I. Singuläre (monochromatische) Färbungen, bei denen nur mit einem einzelnen Farbstoff gefärbt wird. Ihr positives oder negatives Resultat kann uns über den elektrochemischen (oder oxypolaren) oder physikalischen Charakter eines Substrats nur in jenen seltenen Fällen Aufschluß liefern, wo ganz eingeengte, spezialisierte Affinitäten chemischer oder physikalischer Natur vorliegen wie z. B. beim Methylgrün oder den Fettfarbstoffen einerseits, bei absolut basophilen (Mastzellengranula) oder absolut oxyphilen (eosinophile Granula) Substraten anderseits. Sonst müssen wir uns bei diesen Färbungen begnügen, Unterschiede der erreichbaren Farbentöne sowie verschiedene Echtheit der Färbungen differentialdiagnostisch zu verwerten. Man unterscheidet

demnach progressive Färbungen, bei denen die Färbungen bis zu einem gewissen Punkt bzw. bis zum Maximaleffekt fortgeführt werden, von den regressiven Färbungen, bei denen in diesem Punkt die Differenzierung durch entfärbende Agenzien einsetzt.

Als solche kommen in Betracht zuerst indifferente Lösungsmittel der Farbstoffe, wie Alkohol, Aceton, Glycerin, Salz- und Seifenlösungen, Saponinlösungen und Formalin (*Eisenberg*). Größere Widerstandsfähigkeit der Färbung einem dieser Mittel gegenüber bedeutet eine größere physikalische Echtheit, eine stärkere physikalische Bindung des Farbstoffes an das betreffende Substrat (ebenso bei Wasserdifferenzierung). Die chemischen Entfärber wirken auf den Farbstoff selbst oder auf seine Verbindung mit dem Substrat. Säuren wirken auf basische Farbstoffe durch Bildung mehrbasischer leicht diffusibler Salze, die dann ausgewaschen werden, vielleicht auch durch Spaltung der Verbindung von Farbbase und Gewebe; in ähnlichem Sinne wirken Alkalien auf Färbungen mit sauren Farbstoffen entfärbend, u. zw. durch Bildung leicht auswaschbarer Alkalisalze der betreffenden Farbsäuren (vielleicht auch durch Lockerung des Gewebssubstrats). Die Entfärbung durch manche Salze ist eventuell auf Doppelsalzbildung mit dem Farbstoff zu beziehen, wodurch derselbe dem Substrat entzogen wird. In seltenen Fällen beruht die Wirkung der Entfärber auf wirklicher Zerstörung des Farbstoffes, so z. B. wirken oxydierende Agenzien (KMnO_4 , Chlorwasser u. dgl.), indem sie die Farbstoffe in farblose Oxydationsprodukte überführen.

Unterschiede der physikalischen Echtheit werden von *Pappenheim* auf größere oder geringere Konkordanz der physikalischen Eigenschaften (Molekülgröße—Porenvolum) der Farbstoffe und Substrate zurückgeführt. Echte Färbung mit hellen (linksspektralen, kleinemolekulären) Farbstoffen soll auf enge Intermicellarspationen, solche mit dunklen (rechtsspektralen, großmolekulären) auf weite hindeuten, sofern keine elektrochemischen Affinitäten mit unterlaufen (d. h. bei basophilen Substraten kommen dann nur basische, bei oxyphilen nur saure Farbstoffe in Anwendung). Die chemische Echtheit der Färbungen soll nach *Pappenheim* für elektrochemische Affinität zwischen Farbstoff und Substrat sprechen. Echtere Färbung mit einem stark basischen Farbstoff soll demnach im Sinne stärkerer Basophilie des Substrats, solche mit einem stark sauren im Sinne einer stärkeren Oxyphilie zu verwerten sein, sie geben also nur Aufschluß über den relativen Grad der elektrochemischen Affinität, genügen allein aber nicht, um über den absoluten Charakter dieser Affinität (ob positiv oder negativ) zu entscheiden. Die schon oben erwähnte Metachromasie mancher Substrate bei Färbung mit gewissen Farbstoffen berechtigt jedenfalls zur Annahme von mindestens physikalischen Differenzen der verschieden gefärbten Anteile.

II. Kombinationsfärbungen (polychromatische Färbungen) bringen zwei oder mehr Farbstoffe zur Anwendung, u. zw. nacheinander oder nebeneinander.

a) Sukzessive Kombinationsfärbungen führen zu verschiedenen Resultaten je nach dem Charakter und den Affinitäten der verwendeten Farbstoffe und auch je nach ihrer Reihenfolge. Beeinflussen die beiden Farbstoffe einander nicht, so können sie bei gleichen Affinitäten eine Mischfärbung ergeben; sind dabei ihre Gewebsaffinitäten verschieden, so bekommt man eine färberische Differenzierung der mit verschiedenen Affinitäten ausgestatteten Gewebsbestandteile. In diesen beiden Fällen ist die Reihenfolge der Anwendung eine beliebige. Sodann aber können die Farbstoffe aufeinander einwirken. Der erste kann z. B. eine Beize abgeben für den zweiten, natürlich einen mit entgegengesetzter elektrochemischer Affinität. Auf diese Weise kann oxyphiles Gewebe, das basische Farbstoffe ablehnt, oder mit ihnen nur unecht sich färbt, durch Vorbehandlung mit einem sauren Farbstoff für die nachträgliche Annahme eines basischen gebeizt werden, wodurch eine Imprägnation mit dem neutralen Farblack zustande kommt. Diese Umstimmung der Affinität wird nach *Rawitz'* Inversion genannt. Auch kann der zweite Farbstoff den ersten extrahieren, u. zw. entweder indem er mit ihm einen neutralen Farbstoff bildet, der im Überschuß des zweiten Farbstoffes löslich ist (Extraktion von Methylenblau durch Eosin). Oder aber der zweite eliminiert den ersten, weil er dem betreffenden Substrat infolge physikalischer oder chemischer größerer Affinität adäquater ist; Substitution (*Weigert*), eventuell partielle Umfärbung (*Unna*).

b) Simultane Kombinationsfärbungen sind die wichtigsten differenzierenden Behelfe der histologischen Färberei. Bei gleichzeitiger Darbietung von Farbstoffen verschiedener Art wird den differenten Substratbestandteilen Gelegenheit geboten, kraft ihrer verschiedenen physikalischen oder chemischen Affinität eine Elektion zu betätigen. Über den Charakter der elektrochemischen Affinitäten bekommt man am besten Aufschluß durch Anwendung sog. „neutraler Farbstoffgemische“, die recht komplizierte Gemenge eines basischen, eines sauren (bzw. ihrer Ionen) und des aus ihnen gebildeten neutralen darstellen. Alle anderen Gemische sind zu diesem Zwecke ungeeignet, da es nur selten Substrate von absoluter Oxyphilie oder Basophilie gibt, die also jeden Farbstoff von gleichem elektrochemischen Charakter (im ersten Fall basischen, im zweiten sauren) ablehnen (α -Granula der Leukocyten sind absolut oxyphil, γ -Granula absolut basophil, δ -Granula, das Chromatin der Protozoenkerne, die Schaltstücke des Herzmuskels neutrophil). Sonst kann fast jedes basophile Substrat auch mit sauren Farbstoffen sich anfärben, zuweilen sogar physikalisch echter, als mit einem elektrochemisch adäquaten. Nur wenn einem Substrat sowohl ein saurer als auch ein basischer Farbstoff gleichzeitig angeboten wird,

wählt es immer den ihm elektrochemisch affinen. Ist der elektrochemische Charakter eines Substrats auf diese Weise bereits eruiert worden, so kann man nun durch Gemische elektrochemisch gleichartiger und adäquater, aber physikalisch differenter Farbstoffe ein Urteil über seinen physikalischen Charakter zu erlangen suchen. Ein basophiles Substrat, das aus einem Gemisch zweier basischer Farbstoffe den dunkleren auserwählt, ist zugleich cyanophil, wahrscheinlich weitporig, eines, das einen hellen bevorzugen würde, xanthophil, engporig. Ebenso würde nach *Pappenheim* die Untersuchung oxyphiler Substrate durch passend gewählte Gemische saurer Farbstoffe je nach ihren physikalischen Affinitäten ermöglicht.

Wenn wir das bisher Gesagte noch einmal uns vergegenwärtigen, wenn wir die Vielheit der differentiellen Methoden und die Unzahl der zur Verfügung stehenden Farbstoffe bedenken, ebenso die bezüglich der Einwirkungszeit, Konzentration der Lösungen, Kombination von Farbstoffen, Beizen, Entfärbern, Fixatoren möglichen Variationen, so müßten wir eigentlich beim Überfluß der Mittel sehr erschöpfende Beantwortung der im Eingang dieses Kapitels erwähnten Fragen erwarten. Leider erfüllen die tatsächlichen Resultate der histologischen Färbungen diese Erwartungen nur zu einem geringen Teil. Die übergroße Anzahl histologischer Methoden zeigt uns zwar eine reiche Mannigfaltigkeit verschiedener Objekte, die dadurch morphologisch differenziert werden können. Die ungleich wichtigeren Fragen nach den biophysikalischen und biochemischen Grundlagen der morphologisch-färberischen Differenzen können dagegen nur in sehr mangelhafter Weise beantwortet werden. Die Aufschlüsse, die uns die Färbungen darüber liefern, sind sehr summarischer Natur, und auch diese basieren zum Teil auf hypothetischen Annahmen, die ihrer Art nach schwer kontrollierbar sind, oder auf nicht immer zutreffenden, wenn auch noch so geistreichen Verallgemeinerungen. Von einer mikrophysikalischen oder mikrochemischen Analyse durch Färbung sind wir zurzeit noch weit entfernt. „Das histologische Färben konnte sich zwar zu einer hochentwickelten Technik, nicht aber zu einer Wissenschaft ausbilden.“ — Diese vor 35 Jahren niedergeschriebenen Worte von *Gierke* gelten leider auch heute noch fast uneingeschränkt. Es ist zu hoffen und zu wünschen, daß es der seinerzeit von *Zacharias* inaugurierten und in letzter Zeit von *Unna* u. *Golodetz* sowie von *A. Meyer* und seinen Schülern mit Erfolg betriebenen indirekten, mikrochemischen Analyse gelingen möge, diese Lücke auszufüllen. Dieselbe untersucht, wie gewisse durch elektive Färbung gekennzeichnete Gewebsbestandteile verschiedenen Lösungsmitteln und anderen chemischen Reagenzien gegenüber sich verhalten, und vergleicht diese Reaktionen mit denjenigen bekannter biochemischer Substanzen in vitro, um auf Grund übereinstimmender Reaktionen die Identifizierung vorzunehmen.

II. Allgemeine Grundlagen der Bakterienfärbung.

Wie schon in der Einleitung hervorgehoben wurde, verfolgt die Bakterienfärbung zwei Hauptzwecke. Zunächst einen rein morphologisch-deskriptiven, indem sie sich bestrebt, die Gestalt der Bakterien und ihrer Bestandteile möglichst naturgemäß darzustellen bzw. ihre Anwesenheit in verschiedenen Substraten, ihre Anordnung und damit ihre Beziehungen zu diesen Substraten festzustellen. Außerdem aber ist sie in vielen Fällen eine Differenzierungsmethode, u. zw. nach vier Richtungen hin. Erstens soll sie es ermöglichen die Bakterien von den Bestandteilen des Mediums zu unterscheiden, zweitens will sie auch abgesehen von rein morphologischen Unterschieden nach Möglichkeit zur Differenzierung verschiedener Bakterienarten beitragen auf Grund konstanter färberischer Merkmale. Drittens versucht sie auf eben diesem Wege verschiedene Bestandteile der Bakterienzelle zu differenzieren. Endlich geht ihr Bestreben dahin, biologische Zustandsänderungen der Bakterienzelle mittels färberischer Reaktionen zu eruieren und zur Anschauung zu bringen.

Für diese färberische Differenzierung der Bakterien, ihrer Bestandteile bzw. anderer Substrate stehen uns sowohl qualitative als auch quantitative Differenzen zu Gebote. Es kann also ein Substrat (um ganz allgemein zu sprechen) verschiedenen Farbstoffen gegenüber verschieden sich verhalten; es können sodann verschiedene Substrate denselben Farbstoff aufnehmen oder nicht aufnehmen oder im positiven Fall verschiedene Farbentöne aufweisen (Metachromasie). Wichtiger noch als diese immerhin spärlichen qualitativen Unterschiede sind bei der Differenzierung die quantitativen, die sich in der verschiedenen Intensität der Farbentöne sowie im verschiedenen Grad ihrer Echtheit bei physikalischer oder chemischer Entfärbung kundgeben. Auf diesen Unterschieden (die durch Kombinationen der verwendeten Farbstoffe, ihrer Konzentrationen und Lösungsmittel, der Zeitdauer und Temperaturbedingungen ihrer Einwirkung, der angewandten Beizverfahren sowie Entfärber nach ihrer chemischen Natur und Anwendungsweise fast ins Unendliche variiert werden können, aber nicht brauchen!) beruht die Überfülle der angegebenen Färbungs- und Differenzierungsmethoden.

Es ist natürlich weder nötig noch möglich, alle diese Methoden aufzuführen und zu besprechen, das wirklich Wichtige darunter findet seinen Platz in diesem Handbuch im Kapitel „Spezielle Färbungsmethoden“, dorthin muß auch bezüglich der genaueren technischen Angaben verwiesen werden. Hier sollen nur die allgemeinen färberischen Richtlinien dargestellt werden, die Ergebnisse der tinktoriellen Differenzierung und die daran sich knüpfenden Probleme. Auch bezüglich der ersten Frage, der Differenzierung der Bakterien von ihren Substraten, vor allem von tierischen und pflanzlichen Geweben und Säften,

die hier nur nebenbei behandelt wird, sei auf das vorerwähnte Kapitel der tierischen und pflanzlichen pathologisch-histologischen Technik verwiesen.

A. Über Fixierung und Färbung im allgemeinen.

1. **Fixierung.** Reinkulturen entstammende oder in flüssigen Medien suspendierte Bakterien werden meist nach dem Verfahren von *Koch* am Deckglas oder Objektträger angetrocknet und in der Flamme fixiert. Dieses bequeme Verfahren hat jedoch gewisse Nachteile, wenn es sich darum handelt, die wirkliche im Leben vorhandene Größe und Gestalt der Bakterienzelle sowie die Anordnung ihrer Bestandteile zur Anschauung zu bringen. Schon beim Ausbreiten des Materials können, falls nicht besondere Vorsichtsmaßregeln getroffen werden, feine Organe, wie die Geißeln, abgerissen und verfilzt, charakteristische Bakterienverbände zerstört werden. Während des Eintrocknens erfolgt durch Konzentrierung der im Medium enthaltenen (eventuell vom Nährboden mitgebrachten) osmotisch wirksamen Stoffe Plasmolyse der dazu befähigten Bakterien. Sodann bewirkt das Antrocknen, noch mehr aber die Fixation in der Flamme eine Schrumpfung der Bakterienzelle, die wie der Vergleich mit lebensfeuchtem Material lehrt, oft nicht zu vernachlässigen ist. Handelt es sich um feine Strukturen im Inneren der Bakterienzelle, so sind die erwähnten Vorgänge natürlich imstande, sie zu zerstören oder bis zur Unkenntlichkeit zu verzerren. Auch mag noch an die vom Nährboden stammenden organischen Bestandteile erinnert werden, die um die Bakterien herum mitfixiert und mitgefärbt nicht nur das Bild trüben, sondern auch zu bedeutungsvollen Täuschungen (falsche Kapseln, Geißeln, s. *Fischer, Zettnow*) Anlaß geben können. Dasselbe gilt für diejenigen Fälle, wo man, um Schrumpfungen empfindlicher Gebilde zu vermeiden, die Bakterien in eiweißhaltigen Flüssigkeiten (Serum, Eierklar) austreicht (s. darüber unter Kapselfärbung).

Wenn also das gewöhnliche Fixationsverfahren für den gewöhnlichen Laboratoriumsgebrauch sich empfiehlt und auch genügt, so muß man, um die Struktur der Bakterienzelle zu studieren, entweder zur Färbung lebensfeuchten Materials zwischen Deckglas und Objektträger greifen (sog. *vitale*, richtiger *postvitale* Färbung) oder sich an die in der Histologie üblichen chemischen Fixatoren halten, die größere Gewähr für Erhaltung feinerer Strukturen bieten (Sublimat, die von *Hamm* empfohlenen Osmiumsäuredämpfe, Joddämpfe, Formol, weniger empfehlenswert Essigsäure u. a. m.). Man muß dabei im Auge behalten, daß manche dieser Reagenzien auch für die weitere Färbung nicht irrelevant sind, indem sie entweder als Beizen die Färbbarkeit einseitig beeinflussen oder dieselbe herabsetzen. Dasselbe gilt auch für viele der für bakterienhaltige Gewebe gebräuchlichen Fixationsmethoden. Besonders oxydierende Agenzien (Chromsäure, Osmiumsäure, Mineralsäuren) können der nachträglichen Bakterienfärbung gefährlich werden.

Die Färbung lebensfeuchter Bakterien, die von einer vorbereitenden Fixierung absieht, bietet außerdem den Vorteil, daß die Färbung unter Kontrolle des Mikroskops vor unseren Augen erfolgt und dementsprechend feiner abgestuft werden kann. Die gewöhnlich übliche Trockenfärbung geht meist, um prägnante Bilder zu erzielen, auf Überfärbung los, hier werden dagegen stark verdünnte Farblösungen bevorzugt und dementsprechend feine Differenzierungen, die manches zutage treten lassen, was sonst vom Übermaß der Farbe verdeckt wird.

2. Die zur Bakterienfärbung verwendbaren Farbstoffe. Seit *Weigert* u. *Koch* gelten die basischen Anilinfarbstoffe als die Bakterienfarbstoffe „par excellence“. Größere Anwendung fanden bis jetzt Fuchsin, Methylviolett, Krystallviolett, Gentianaviolett, Methylenblau, Toluidinblau, Azur, Thionin, Safranin, Neutralrot, Vesuvin, Chrysoidin, Pyronin, Malachitgrün. Außer ihnen kann aber eine große Anzahl minder bekannter mit Erfolg zur Bakterienfärbung benutzt werden, z. B. Nachtblau, Viktoriablau B und 4 R, Baslerblau, Neufuchsin, Pararosanolinsalze, Reginaviolett, Parme, Anilinblau, Äthylgrün, Viktoriagrün, Janusrot, Janusgrün, Brillantkresylblau, Kresylechtviolett, Nilblau, Capriblau, Acridinorange, Acridinrot, Neumethylenblau, Methylengrün, Fuchsia, Amethystviolett, Indazin, Indaminblau, Paraphenylenblau, Bindscheidl's Grün, Cyanin u. a. (*Eisenberg*). Manche davon färben tief und echt, andere nur schwach und eignen sich deshalb nur wenig zu praktischem Gebrauch. So z. B. Rhodamin B, das nur schwach anfärbt und leicht ausgewaschen wird. Das als Kernfarbstoff proklamierte Methylgrün färbt meist nur die stärker farbauffinen grampositiven Arten und auch diese nur schwach und unecht (*A. Fischer, Unna, Eisenberg*); im Methylgrün-Pyronin-Gemisch (*Unna, Pappenheim, Whitney, Saathof*) prävaliert die Färbekraft des Pyronins, das die Bakterien anfärbt, während das Methylgrün nur von Zellkernen fixiert wird. Die Ursache dafür soll nach *Unna* in der großen Reduktionsempfindlichkeit dieses Farbstoffes liegen.

Saure Farbstoffe wurden bisher meist in der Bakteriologie nur als Kontrastfarben zur Färbung der Gewebe oder des Milieus benutzt, um durch die Differenz der Farbtöne die Bakterien besser sich abheben zu lassen (so z. B. Patentblau in der Methode von *Frosch*) oder als Entfärber (*Kühne, Pappenheim*). Demgegenüber wird es nicht uninteressant sein darauf hinzuweisen, daß der erste Farbstoff, mit dem Bakterien überhaupt tingiert wurden, ein saurer war, u. zw. Hämatoxylin (*Weigert*), mit dem dann *Koch* sowie *Neuhauss* unter Verwendung von Chromsäurebeize bei manchen Bakterien selbst Geißeln darstellen konnten, *Wolters* sogar Leprabacillen färbte. Vereinzelt wurden auch später saure Farbstoffe zur Bakterienfärbung verwendet, so Eosin für Tuberkelbacillen (mit Essigsäure nach *Wesener* und Sublimat nach *Gasis*) und das verwandte Cyanosin (ebenfalls für Tuberkelbacillen *Eisenberg*), Pikrinsäure (*London* für Cholera), Primulin

und Hessisch Bordeaux für Typhus und Coli (*Wagner*), Alauncarmin für Rhinosklerom (*Mibelli*), Georginen- und Brombeerenfarbstoff für gramnegative Arten (*Claudius*), Säurefuchsin für die Hüllen der Kokken (*Unna*). Auch wurde mehrfach Orcein zur Darstellung der Aktinomyceskolben benutzt (*Israel*, *Weigert*, *Ciechanowski*), Eosin zur Gegenfärbung von Bakterienkapseln (*Cornil* u. *Babes*). Carmin und Hämatoxylin färben nur gewisse Kokken ziemlich schwach (*Cornil* u. *Babes*). *Marpmann* hat Bakterien mit Hämatoxylin und Nigrosin gefärbt. Neuerdings will *Glück* mit Säurefuchsin (nach *Altmann*) degenerierte Gonokokken zur Darstellung gebracht haben. Das waren jedoch meist nebensächliche Befunde, die keine allgemeine Bedeutung erlangt haben, und in vielen Lehrbüchern galt der Satz, saure Farbstoffe eigneten sich nicht zur Bakterienfärbung. Eingehende Untersuchungen von *Eisenberg* haben demgegenüber ergeben, daß es mit vielen, wenn auch nicht mit allen sauren Farbstoffen gelingt, Bakterien mehr oder minder stark zu färben. Der Unterschied gegenüber den gebräuchlichen basischen Farbstoffen liegt vor allem darin, daß die sauren der Mithilfe des Erhitzens oder von Beizen bedürfen, um deutlich und genügend echt zu färben. Unter diesen Bedingungen bekommt man aber mit vielen Resultate, die an Intensität und Echtheit nichts zu wünschen übrig lassen, ja es konnten selbst schöne und genügend echte Sporenfärbungen erzielt werden. Schöne Färbungen geben z. B. Chinablau, Reinblau, Alkaliblau, Wasserblau, Patentblau, Rotblau, Brillantschwarz, Dianilblau, Diaminblau, Echttrot, Lichtgrün, Guineagrün, Naphthylaminbraun, Säurefuchsin, Azorubin, Chromotrop 4 R, Aurantia, Bordeaux, Bordeaux R, Ponceau R, Brillanterocein-, Azogelb, Viktoriascharlach, Neucocein, Echtbraun G, Naphtholorange α und β , Ponceau 6 RF, Echttrot, Cyanosin, Methyleosin, Eosin, Erythrosin, Rose bengale, Safrosin, Chrysolin, Wollschwarz, Wollschwarz 4 B. Wie man sieht, sind die verschiedensten Farbstoffgruppen, ebenso verschiedene Farbentöne repräsentiert; im Gegensatz zum Verhalten bei der Vitalfärbung sind auch Sulfosäurefarbstoffe hier gut verwendbar. Interessant ist die orangegelbe Färbung mit „wasserlöslichem Korallin“ (Natriumsalz der p-Rosolsäure), die also im Tone der freien Farbsäure, nicht in demjenigen des Farbsalzes (rot) erfolgt, also eine Spaltung des Salzes mit Adsorption der Farbsäure annehmen läßt. Auf ältere Beobachtungen zurückgreifend hat dann *Feser* gezeigt, daß mit Hämatoxylin, besonders mit Jod-Hämatoxylin unter Erwärmen gute Bakterienfärbungen erzielt werden können. In neuester Zeit hat *Huntoon* ebenso wie vor ihm *Eisenberg* Säurefuchsin zur Sporenfärbung verwendet.

Die indifferenten Farbstoffe eignen sich nicht zur Bakterienfärbung im allgemeinen (Sudanbraun färbt Cytoplasma blaßbraun, Indophenol hauchartig violett *Eisenberg*), manche davon können zur Färbung von Fetteinschlüssen verwendet werden (darüber weiter unten). Neutrale Farbstoffe als solche nehmen Bakterien nicht

auf, sondern entziehen ihnen die basische Komponente (so z. B. Methylenblau-pikrat bei der *Fontesschen* Methode), dagegen können sie im Entwicklungsverfahren auf den Bakterien selbst erzeugt werden und liefern dann intensive Färbungen (*Eisenberg*, s. weiter unten). Hier wäre die alte Angabe von *Kühne* (1888) zu erwähnen, wonach durch Vorfärbung mit dem Säurefarbstoff Schwarzbraun die Fuchsinfärbung von Nichtsäurefesten so verstärkt wird, daß sie der Entfärbung mit Fluoresceinalkohol standhält.

Wenn wir nach den Ursachen der verschiedenen Färbbarkeit der Bakterien mit den basischen und sauren Farbstoffen fragen, so können verschiedene Tatsachen zur Erklärung herangezogen werden. Das Bakterienprotoplasma ist ein amphoter reagierendes Kolloidgemisch, ist also im Prinzip befähigt, sowohl basische als saure Farbstoffe zu fixieren (ob chemisch oder adsorptiv oder beides zugleich, mag unentschieden bleiben). Die basischen Affinitäten (Basophilie) scheinen aber zu überwiegen, was sich unter andern auch in der anodischen Konvektion kundgibt. Außerdem kommt vielleicht bei vielen basischen Farbstoffen ihre geringe Löslichkeit und dadurch gesteigerte Adsorbierbarkeit in Betracht, während z. B. die Fixierung der Sulfofarbstoffe infolge ihrer großen Löslichkeit und Diffusibilität beschränkt ist. Auch innerhalb der beiden Farbstoffgruppen können Unterschiede der elektrochemischen Affinität, der Löslichkeit und Diffusibilität die Eignung der einzelnen Farbstoffe zur Bakterienfärbung beeinflussen. So z. B. hängt die schlechte Eignung des Rhodamins wahrscheinlich mit der fast neutralen Natur dieses formell basischen Farbstoffes zusammen. Manche Farbstoffe können schon deshalb vielleicht nicht genügend färben, weil sie nicht genügend wasserlöslich sind (Gallein, Cörulein, Purpurin, Alizarineyanin, Alizarinblau S, lauter Säurefarbstoffe) (*Eisenberg*).

3. Beizen. Die Anwendung derselben bezweckt, wie auch in der Histologie, sonst nicht färbbare Bakterien oder deren Bestandteile der Färbung zugänglich zu machen, bei schwach färbbaren die Intensität der Färbung zu erhöhen oder deren Echtheit zu steigern, damit sie Entfärbungsprozeduren standhalten können. Diese Wirkungen können erreicht werden entweder durch Beeinflussung des Substrats, d. h. der Bakterien oder der Farbstoffe oder endlich durch Kombination beider Faktoren. Bei der Beeinflussung der Bakterien werden die Beizen oft vor der Färbung angewandt (*Vorbeizung*), bei beabsichtigter Einwirkung auf den Farbstoff wird die Beize ihm meist beigegeben (*simultane Beizung*), will man das Färbungsprodukt beeinflussen, so wird man die Beizung der Färbung meist nachfolgen lassen (*Nachbeizung*), doch gelten diese Regeln nicht ausnahmslos.

A. Die Wirkungen der Beizen auf Bakterien fallen zum Teil zusammen mit den Aufgaben der Fixation, sofern sie durch physikalische (kolloidchemische) Zustandsänderungen der zu färbenden

Substanz die Bindung von Farbstoffen ermöglichen oder verstärken. Meist handelt es sich in diesen Fällen um eine Verdichtung bzw. Koagulation des Protoplasmas oder seiner Anteile; hierher gehören manche Säuren wie Phosphorwolframsäure (für Spirochäten nach *Reitmann*), Gerbsäure (viele Geißelfärbungsmethoden, für Spirochäten nach *Procu* u. *Vasilescu*, nach *Spina* werden sogar viele Bakterienarten durch lange Tanninimprägnation säurefest), Osmiumtetroxyd (für Geißeln nach *Plaut*, *van Ermenghem*, *Hugh Williams*), Brechweinstein (für Geißeln nach *Zettnow*), Eisensalze (*Spina*), Sublimat, Goldchlorid (*Eisenberg*), Formaldehyd (*Baumgarten*, *Rübiger*), vielleicht Kaliumpermanganat (Geißelmethode von *Gemeili*). Eine Abdichtung der wasserreichen Kapselsubstanz bezweckt auch die Essigsäurebeizung (*Friedländer*) und Formolbeizung (*Rübiger*). Durch Gerbsäure, Aurantia, Pikrinsäure und andere Nitrophenole, Phenol, Methylalkohol, Ameisensäure, Essigsäure, Sublimat, Goldchlorid kann das Ektoplasma bzw. die Membran der färberischen Darstellung zugänglich gemacht werden (*Eisenberg*), wahrscheinlich ebenfalls auf dem Wege einer Abdichtung.

Eine entgegengesetzte Beeinflussung bezwecken die verschiedenen Vorbereitungsbeizen für Sporenfärbungen. Hier will man die durch kompakte Struktur und vielleicht auch durch Impermeabilität der Membran bedingte Färbungsresistenz überwinden, indem man die Struktur lockert (Maceration). Das wird erreicht durch konzentrierte Schwefelsäure (*Buchner*), Chlorzinkjod oder Chromsäure (*Möller*, *Ernst*, *Trincas*), erhitze Salzsäure (*Aujeszký*), erlitztes Platinchlorid (*Thesing*), Natriumsalicylat (*Orszag*), Kupfersulfatammoniak (*Lagerberg*), Formol (*Bitter*). Eine ähnliche Wirkung, d. h. Auflockerung des Protoplasmas und gesteigerte Permeabilität haben wahrscheinlich auch die verschiedenen Alkalien und alkalischen Salze, die als Beizen Verwendung gefunden haben (*Bitter*, *Waldmann*, *Bierbaum*, *Kent*), sofern sie nicht direkt auf die Farbstoffe selbst einwirken. Der Einfluß erstreckt sich hier wohl nicht nur auf die Eiweißkörper, sondern auch auf die Lipoide, die z. B. bei den Säurefesten in hervorragendem Maße an der Färbungsresistenz beteiligt zu sein scheinen. Das gilt sowohl für jene Fälle, wo Alkalien als Vorbeize Verwendung gefunden haben (z. B. Spirochätenfärbung nach *Shmamine*), als auch für die noch später zu besprechenden Methoden der Simultanbeizung mit Alkalien.

Die Einwirkung auf Lipoide im Sinne einer kolloidchemischen Zustandsänderung haben die Alkalien gemeinsam mit einer Reihe von lipoidlöslichen Beizen. *Ehrlich*, dem wir auf diesem Gebiete viele wichtige Aufklärungen und Anregungen verdanken, glaubte zuerst, daß die Wirkung des von ihm zuerst bei der Tuberkelbacillenfärbung als Beize eingeführten Anilins ebenso wie bei dem von *Koch* gebrauchten KOH auf seinem (übrigens sehr schwach ausgesprochenen) basischen

Charakter beruht. Nachdem aber *Ziehl* im Phenol eine (sehr schwach) saure Beize gefunden hatte, änderte er seine Auffassung dahin, daß derartige Beizen die fettartige Hülle der Säurefesten permeabel machen, außerdem aber mit den Farbstoffen ölige, leicht sich abscheidende Verbindungen geben, die leichter fixiert werden. Da Lipaide auch in anderen Bakterienarten einen Anteil am Aufbau des Protoplasmas nehmen und da sie auch bei der Speicherung (Adsorption) der Farbstoffe eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen (*Löwe*), kann die färbungsbegünstigende Wirkung dieser Art von Beizen verständlich erscheinen. Ihre Anzahl ist eine recht beträchtliche. Es fanden unter anderem Verwendung: Phenol (*Ziehl* u. a.), Resorcin, Pyrogallol (*Ziehl*), Anilin, Toluidin (*B. Fraenkel*), Phenylamin (*Rémy-Sugg*), Thymol (*Brieger, Klemperer, Kühne*), Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Vanillin (*Ehrlich*), Kreosot, Menthol, Campher, Terpentinöl (*Ogawa*), Nelkenöl (*London*), Thymen (*Unna*), Petroläther (*Ishiwara*), Chloroform (*Arens*), Pyridin (*de Souza*), Chinolin (*Burchardt*). Nach *Unna* sollen diese Phenol- und Aldehydbeizen außerdem noch eine Rolle als Sauerstoffüberträger spielen und dadurch der nachträglichen Reduktionsentfärbung der Präparate entgegenwirken.

Möglicherweise spielt die Lipoidlöslichkeit auch eine Rolle bei einer Reihe von Beizen, die mit basischen Farbstoffen schwerlösliche oder unlösliche Verbindungen geben, wie Jod, Brom, Pikrinsäure und andere Nitroderivate, Naphthole; auf dieselben wird bald zurückzukommen sein. Ganz sicher spielt die Lipoidlöslichkeit der Beizen eine Rolle bei der Färbung von Fetteinschlüssen mit basischen Farbstoffen (nicht indifferenten); dadurch, daß sie vom Lipoidinhalt dieser Vakuolen gelöst werden, kann hier die Bildung einer Verbindung mit dem basischen Farbstoff erfolgen, die ebenfalls gelöst bleibt. Es erfolgt hier gewissermaßen eine Farblackbildung, nur wird der Lack nicht in unlöslicher Form niedergeschlagen, sondern vom Fett gelöst. Solche Beizen sind Naphthole, Jod, Brom, Pikrinsäure und andere Nitrokörper, Sublimat, Goldchlorid (*Eisenberg*) (darüber weiter unten ausführlicher!).

In manchen Fällen endlich kann die Einwirkung der Beize auf das Substrat darin beruhen, daß dasselbe dadurch eine ihm vorhin abgehende Affinität für gewisse Farbstoffe erlangt. Diese Deutung trifft vielleicht zu für die Tanninbeizung der Geißeln, die sich normalerweise mit basischen Farbstoffen kaum oder sehr schwer färben, von sauren schwach und diffus gefärbt werden. Die Gerbsäure könnte nun neben ihrer koagulierenden und verdichtenden Wirkung möglicherweise den Geißeln die fehlende Basophilie verleihen (Inversion der elektrochemischen Affinität).

Ungeklärt ist noch die Art der Beizwirkung der Salpetersäure bei der Körnchenfärbung der Säurefesten (*Voltolini, Lutz, Unna, v. Betegh, Ishiwara, Boit, Eisenberg*), es könnte sich um Nitrierung von Eiweißstoffen oder Lipoiden handeln oder um Oxydation und dadurch be-

dingte Herabsetzung der Färbbarkeit des restlichen Zelleibes, die die elektive Färbung der Granula fördert.

B. Einwirkungen der Beizen auf die Farbstoffe werden vor allem bei simultaner Beizung zu suchen sein, doch auch bei Vor- und Nachbeizung spielen sie sicher vielfach eine bedeutende Rolle. Dieselben können sehr verschiedener Natur sein. Da, wie wir gesehen haben, die Farbstofflösungen mehr oder minder kolloidal sind, so werden vor allem Beeinflussungen des Dispersitätsgrades in Betracht kommen, die die Adsorption erleichtern oder erschweren können. Eine Verminderung der Dispersion, Vergrößerung der Molekularaggregate wird der Adsorption förderlich, eine Steigerung der Dispersion, Annäherung an wahre Lösung ihr hinderlich sein. Im letzteren Sinne wirken vor allem die Lösungsmittel, die wir als Entfärber eingehend weiter unten zu besprechen haben. *Gottstein* glaubte seinerzeit, die Färbungsförderung durch die oben angeführten lipidlöslichen Beizen darauf zurückführen zu müssen, daß ihre wässerigen Lösungen mehr Farbstoff auflösen als Wasser für sich allein, daß sie also erlauben, mit konzentrierteren Lösungen den Bakterien an den Leib zu gehen. Dem ist entgegenzuhalten, daß Zusatz von konzentrierten alkoholischen Farblösungen zu Wasser nur bis zu einem gewissen Grad den Färbungseffekt steigert, darüber hinaus aber trotz steigender Farbstoffkonzentration herabsetzt, so daß rein alkoholische Fuchsinlösungen trotz 10fach stärkerer Konzentration viel schwächer färben, als die gewöhnliche alkoholisch-wässrige. Viel näher liegt (außer der schon besprochenen Beziehung zu den Lipoiden) die Annahme von *Ehrlich*, daß ihre Neigung zur Abscheidung öligter Farbstoffverbindungen den Färbungseffekt erhöht, jedenfalls ist diese Anschauung gut mit den Erfahrungen der Kolloidchemie in Einklang zu bringen.

In einer (eventuell mit beginnender Ausfällung der Farbbase verbundenen) Herabsetzung der Dispersität mancher basischer Farbstoffe findet die beizende Wirkung von Alkalien und alkalischen Salzen zum großen Teil ihre Erklärung. Auf ihr beruht die Verwendung von Kalilauge (für Tuberkelbacillen mit Methylenblau nach *Koch*, mit Gentianaviolett nach *Kitt*, für Spirochäten mit Fuchsin oder Krystallviolett nach *Shmammine*, für alle Bakterien mit Methylenblau nach *Löffler* sowie *Unna*, für Geißeln mit Fuchsin nach *de Rossi*, für Sporen nach *Kent*, *Waldmann*, *Bitter*, *Bierbaum*), Soda, Ammoniak (für Tuberkelbacillen mit Fuchsin nach *Renaut*, mit Gentianaviolett nach *de Angelis*, für Sporen nach *Fiocca*, *Bitter*, für alle Bakterien nach *Rosam*), Ammoniumcarbonat (nach *Kühne*, für Tuberkelbacillen mit Krystallviolett nach *Hermann*), Lithiumcarbonat (mit Fuchsin oder Gentianaviolett für Gram-Färbung nach *Weigert* sowie *Wolff*, mit Methylenblau zur Spirochätenfärbung nach *Goldhorn*), Borax (mit Methylenblau nach *Manson*, *Sahli*, *Falières*, mit Fuchsin oder Methylen-

violett zur Tuberkelbacillen- und Sporenfärbung nach *Eisenberg*), Natriumarsenit (mit Malachitgrün zur Spirochätenfärbung nach *Löffler*, mit Fuchsin oder Methylviolett zur Tuberkelbacillen- und Sporenfärbung nach *Eisenberg*, mit Methylenblau zur Tuberkelbacillenfärbung nach *Bozelli*), Silberoxyd (mit Methylenblau im Bleu Borrel). Von organischen Basen wäre das schon erwähnte Anilin, Pyridin, Äthylendiamin (*Schäffer*), Phenylamin (*Rémy-Sugg*), Chinolin (*Burchardt*) zu nennen.

Nicht alle diese Kombinationen sind der gleichen Deutung zugänglich. Erstens ist diese Wirkung alkalischer Beizen im Prinzip nur bei basischen Farbstoffen möglich und auch hier nicht bei allen. Eine Ausscheidung der Farbbase ist natürlich bei Salzen der Ammoniumbasen (z. B. Methylenblau, Safranin) nicht möglich, hier müssen folglich andere Faktoren an der tatsächlich beobachteten Färbungssteigerung beteiligt sein. Bei anderen Farbstoffen ist es angezeigt, den Alkalizusatz so zu bemessen, daß keine richtige Fällung erfolgt, dann wäre nämlich der Färbungseffekt gleich Null, sondern nur das Vorbereitungsstadium der makroskopischen Fällung, das sich durch Trübung der Farblösung kundgibt und erst allmählich zur Ausflockung hinüberführt. *Unna* hat mit großem Scharfblick dieses Stadium der herabgesetzten Löslichkeit, der *Schwebefällung*, als der Färbung besonders günstig erkannt und den Satz aufgestellt, daß „die Farbstoffe sich mit dem Substrat umso leichter vereinigen, je schlechter sie in ihrem Lösungsmittel gelöst sind, ohne daß sie bereits ausgefällt werden“. In Übereinstimmung damit zeigen die stalagmometrischen Untersuchungen von *Traube*, daß unter solchen Umständen noch lange, bevor sichtbare Flockungen von Farbstoffen oder anderen kolloiden Lösungen erfolgen, bereits starke Dispersitätsänderungen der Teilchen vor sich gehen können. Ist ein Farbstoff sehr alkaliempfindlich, so erfolgt das Zusammenbringen mit der alkalischen Beize zweckmäßig ex tempore erst auf dem Präparat, um eine vorzeitige Fällung zu vermeiden.

In denjenigen Fällen, wo der Alkalizusatz zu schwach ist, um die Farbstoffbase in „Schwebefällung“ zu versetzen, muß man natürlich nach anderer Erklärung der Beizwirkung sich umsehen. Als solche kommen in Betracht erstens die schon erwähnte Einwirkung auf das Substrat im Sinne einer Permeabilitätssteigerung. Sodann könnte vielleicht *Kontaktelektroskopie* zur Erklärung herangezogen werden (*Pelet-Jolivet*): die alkalische Beize steigert die negative Ladung des Substrats und damit seine adsorptive oder chemische Affinität für den basischen Farbstoff. Endlich muß man daran denken, daß in manchen Fällen, besonders im bestbekannten und wichtigen Fall der alkalischen Methylenblaulösungen, das Alkali bei längerer Einwirkung eine teilweise Umwandlung des Farbstoffes bewirkt, die für seinen färberischen Effekt wichtig sein kann. Im erwähnten Fall entsteht bekanntlich das „Rot aus Methylenblau“ (*Nocht*)

oder Methylviolett + Methylenazur (*Michaelis*), das in Verbindung mit Eosin die theoretisch und praktisch wichtige Chromatinfärbung der *Romanowski-Methode* und ihrer Abkömmlinge bewirkt und die polychromatische Differenzierung des polychromen Methylenblaus nach *Unna* mit bedingt.

Als Analogie zur Beizwirkung der Alkalien bei basischen Farbstoffen wäre die oben bereits erwähnte Farbverstärkung der sauren Farbstoffe durch Zusatz von Säuren bzw. sauren Salzen (*Eisenberg*) anzuführen.

In die Klasse der chemischen (und dadurch auch physikalischen) Umwandlung der Farbstoffe durch Beizen gehören auch die zahlreichen Fälle, wo die Beizen mit den Farbstoffen (auch hier kommen vor allem basische in Betracht) schwerlösliche oder wasserunlösliche Verbindungen eingehen, wodurch natürlich die Echtheit der betreffenden Färbungen bedeutend erhöht, zuweilen auch ihre Nuance verändert wird. Nur diese Beizen werden von *Unna* als solche anerkannt. Als Prototyp dieser Art von Beizen mag das Jod gelten, das bei der *Gram-Methode* und ihren Modifikationen, Granula der Säurefesten (*Much, Kronberger, Eisenberg, Kirchenstein, Porges* u. a.), bei der Fettfärbung (*Eisenberg*), bei der Körnchenfärbung der Diphtheriebacillen (*Gins*), bei der Fixation des synthetisch erhaltenen Indophenols (*Schulze, Gräff, Lode, Gierke*), bei der Färbung des *Corynebacterium fusiforme* (*Vincent*) Verwendung findet. Meist wird es in Form der *Lugolschen Lösung* benutzt, es kann aber auch als Jodtinktur (*Kronberger, Eisenberg*) oder in Form von Jodwasserstoffsäure (*Eisenberg, Porges*) wirken (wobei die entfärbende Wirkung des Alkohols oder der H-Ionen zu beachten ist) oder aus Jodkali durch Wasserstoffsuperoxyd (*Unna*) oder Kaliumferrieyanid (*Stephan*) auf dem Präparat entwickelt werden. *Unna* verdanken wir die Aufklärung seiner Wirkungsweise, die in der Bildung einer in Wasser kaum löslichen (alkohollöslichen) Farbstoffverbindung beruht. Die Jod-Pararosanilin-Verbindungen sollen fester sein als die Jod-Rosanilin-Verbindungen, doch wurden auch Rosanilinfarbstoffe (ebenso viele andere) mit Erfolg bei diesen Methoden verwendet (*Baumgarten, Eisenberg, Reichert*). Dem Jod ist das Brom im Prinzip gleichwertig (*Nicolle, Mérieux, Eisenberg*), das Chlor wirkt zu stark oxydierend, Fluor scheint nicht versucht worden zu sein. Als Beize fand weiterhin an Stelle des Jods die Pikrinsäure vielfach Anwendung (*Claudius, Tarchetti, London, Spengler, Eisenberg, Kronberger*), ebenso ihre Salze und verschiedene aromatische Nitrokörper wie Trinitrokresol, Trinitroxylol, Trinitroresorcin, Trinitroanilin, Trinitrobenzoesäure, Dinitrobenzol, Nitrophenol, Pikrylchlorid, Pikraminsäure, Naphtholgelb, Martiusgelb, Aurantia, Viktoriagelb, Trinitrokresotinsäure, Trinitrotoluol (*Eisenberg*). Hierher gehört ferner α - und β -Naphthol (*Unna, Eisenberg*), nicht aber Verbindungen, die am Naphthylradikal die salzbildende Hydroxylgruppe ver-

missen lassen. Hierher gehören auch die lipoidlöslichen Metallsalze Sublimat und Goldchlorid (*Unna, Nastiukow u. Pewsner, Procau, Vasilescu, Eisenberg*), während lipoidunlösliche Metallsalze nicht verwendbar sind. Mehr oder weniger unlösliche Verbindungen mit basischen Farbstoffen gibt ferner die Gerbsäure (*Nicolle, Eisenberg, Nicolas, Favre u. André*) sowie ihre bei Geißelfärbung verwendeten Eisensalze, daneben kommt natürlich ihre Wirkung auf die Bakterien selbst sowie zum Teil auch entfärbende, differenzierende Wirkung in Betracht.

In die Klasse der chemischen Umwandlungen von Farbstoffen durch Beizen wäre ferner auch die Beizwirkung von Formaldehyd sowie Chromsäure einzureihen. Bekanntlich entsteht durch Formolwirkung aus Fuchsin ein violetter Farbstoff, wahrscheinlich eine Methylenverbindung des Rosanilins (*Nietzki*). Diese Eigenschaft findet Verwendung bei der Tuberkelbacillenfärbung nach *Biot*: die mit Carbofuchsin gefärbten und mit Alkohol sowie Salpetersäure differenzierten Präparate werden mit Formol nachgebeizt und zeigen dann die Tuberkelbacillen in violettschwarzer Farbe. Nach *Eisenbergs* Formol-Carbofuchsin-Methode werden die Präparate mit erhitztem Ziehlschen Fuchsin, das 1% Formaldehyd enthält, gefärbt und mit Salzsäure-Methylalkohol differenziert. Auch hier erscheinen die Bacillen tief violett, der Rest rot. Ebenso bewirkt Chromsäure eine Umwandlung des Fuchsin in einen violetten Farbstoff; erwähnenswert ist, daß nur mit Carbofuchsin gefärbte Tuberkelbacillen durch Chromsäure violett umgefärbt werden (*Eisenberg*), dagegen mit Alkohol und Salpetersäure behandelte rot bleiben, während das Sputumsubstrat lila umgefärbt erscheint (*Ulrichs*). Unerklärt ist die Beizwirkung des Formols auf Methylviolett bei der Gram-Modifikation von *Chaussé* (für *Aktinomyces*), sowie bei den Methoden von *Kilduffe u. Monay*.

Als in ihrem Wesen gleich sind hier diejenigen Beizwirkungen anzureihen, die saure Farbstoffe für basische und umgekehrt abgeben. Die dabei entstehenden Verbindungen (farbsaure Farbbasen) sind großmolekulär und können in geeigneten Kombinationen sehr echte Färbungen liefern, da sie meist in Wasser schlecht löslich oder unlöslich sind. Sie sind meist alkohol- und lipoidlöslich, auch können sie mit verschiedener Leichtigkeit im Überschuß einer der beiden Komponenten aufgelöst werden, was ziemlich komplizierte Verhältnisse gibt (so z. B. die Methylenblau- und Methylenazur-Eosin-Verbindungen nach *Michaelis*). Nach *Teague u. Buxton* sind gerade hochkolloide Farbstoffe sehr zur Lösung solcher Verbindungen befähigt (Schuttkolloidwirkungen), schwachkolloide nur in geringem Grade. Will man also auf dem Wege der Beizung echte Färbungen mit diesen Farbstoffen erzielen, so muß der stärker kolloidale zuerst angewendet werden, der weniger kolloidale als zweiter. Dieser Regel folgt die erste übrigens unbewußte Anwendung dieses Beizungsprinzips in Form der *Claudius*-Methode (Methylviolett, dann Pikrinsäure), hierher

gehört auch die Angabe von *Kühne*, daß Vorfärbung mit Schwarzbraun die Fuchsinfärbung auch bei Nichtsäurefesten widerstandsfähig macht gegen Fluoresceinalkohol. In neuerer Zeit hat *Eisenberg* gezeigt, daß auf diesem Wege eine große Anzahl schöner und prägnanter Färbungen zu erzielen ist, u. zw. sowohl unter Vorbeizung, wie unter Nachbeizung mit Säurefarbstoffen, sowie daß dadurch auch grampositive und gramnegative Arten bei entsprechender Differenzierung unterschieden werden.

Bei all diesen Beizvorgängen, wo Verbindungen zwischen Beizen und Farbstoffen entstehen können, ist es natürlich Vorbedingung, daß das entstehende Produkt, sei es Farbsalz oder Doppelsalz (*Unna*), noch eine Affinität für das Substrat frei hat, mag dieselbe physikalischer, elektrochemischer oder oxypolarer Natur sein; sonst kommt natürlich die dreifache Bindung: Substrat—Beize—Farbstoff nicht zustande. Wie wir später sehen werden, braucht die Affinität der Bakterien für die Beize-Farbstoff-Verbindung nicht bei allen Arten gleich stark zu sein und ist darauf z. B. die wichtige *Gram*-Differenzierung aufgebaut. Eine Färbung mit der fertigen Verbindung gibt meist kein richtiges Resultat, höchstens, wie wir sehen werden, bei den Fetteinschlüssen.

Bedeutet die Beizung bei den basischen Farbstoffen meist nur eine Steigerung ihrer Intensität und Echtheit, so ist sie in vielen Fällen bei sauren Farbstoffen eine Vorbedingung einer verwendbaren Färbung überhaupt. Waren dort basische Stoffe zu einer Steigerung der Farbwirkung befähigt, so sind es hier vor allem saure Zusätze, also verschiedene anorganische und organische Säuren in verschiedenen Konzentrationen sowie saure Salze (z. B. Alaun). Ihre Wahl und Konzentration muß sich zum Teil nach dem verwendeten Farbstoff richten, auch hier nämlich können schwächer saure Farbstoffe durch stärkere Säuren ausgeflockt werden, es müssen also in solchen Fällen, um dies zu vermeiden und den der Färbung günstigen Vorgang der „Schwebefällung“ herbeizuführen, nicht allzu starke Säurezusätze gebraucht werden. Bei starken Farbsäuren ist diese Eventualität nicht zu befürchten und können hier auch starke Säurezusätze (bis 10% H_2SO_4) erfolgen. Im ersten Fall wird man ähnlich wie bei den basischen Farbstoffen die Herabsetzung des Dispersitätsgrades der Farbstoffe, im zweiten Erscheinungen der Kontaktelektrisierung (positive Umladung der Bakterien durch H-Ionen) und dadurch gesteigerte Affinität zum Säurefarbstoff zur Erklärung der Beizwirkung heranziehen dürfen.

Die in der Histologie viel gebrauchten metallischen Beizen, die mit den Säurefarbstoffen Farblacke geben, fanden bei der Bakterienfärbung Verwendung in Form der Eisenhämatoxylinmethode von *Heidenhain* (vielfach verwendet bei Zellstudien an Bakterien), als Chromsäurebeizung für Hämatoxylin (*Koch* und *Neuhaus* für Bakteriengeißeln) sowie bei der Leprabacillenfärbung von *Wolters* (Vanadinchlorür und Aluminiumchlorid für Hämatoxylin). Außerdem kommen

für saure Farbstoffe noch manche der oben genannten lipoidlöslichen Beizen in Betracht, so Phenol, Pikrinsäure, Sublimat (mit Eosin, Cyanosin und anderen Phthaleinfarbstoffen nach *Nastukow* und *Pewsner, Gasis, Eisenberg*). Hier kommt wohl vor allem die Einwirkung auf die Bakterien selbst in Betracht, vielleicht daneben auch der saure Charakter. Wird nach den oben erwähnten Methoden ein Säurefarbstoff als Nachbeize für einen basischen gebraucht, so kann man den Fall auch so auffassen, daß hier der basische Farbstoff eine Vorbeize für den sauren abgibt.

Unaufgeklärt ist bis jetzt die Wirkung der Borsäure im Borphuchsin von *Lubimoff* (für Tuberkelbacillen) und im Bormethylenblau von *Kretting* (für die Bakterien von *Ducrey-Unna*), ebenso die Farbverstärkung durch Formaldehyd (*A. Meyer, Ohlmacher, Money, Kilduffe, Eisenberg*), sofern sie nicht auf einer Abdichtung des Substrats beruht. Aus Fuchsin wird durch Formaldehyd eine violette Methylenverbindung gebildet, die sich färberisch etwas anders verhält als der Ausgangsfarbstoff. Eine Umwandlung des Farbstoffs (ob oxydative?) erfolgt wahrscheinlich bei der Beizwirkung der Chromsäure auf polychromes Methylenblau (*Mentz von Krogh*) sowie auf Fuchsin (für Tuberkelbacillen *Eisenberg, Ulrichs*).

4. Entfärber. Ist durch substantive oder objektive Methoden eine intensive Bakterienfärbung erzielt worden, so muß man in vielen Fällen, wenn man eine differentielle Färbung sei es der Bakterien gegenüber dem Milieu, sei es verschiedener Bakterienarten untereinander, sei es verschiedener Anteile der Bakterienzelle anstrebt, durch entfärbende Prozeduren die Differenzierung des Bildes bewirken.

Als Entfärber kommen erstens in Betracht Stoffe, die den Farbstoffen gegenüber sich indifferent verhalten und nur als gute Lösungsmittel dieselben durch physikalische Affinität dem Substrat entziehen. Als allgemeinsten und schonendsten Entfärber dieser Art kann das Wasser gelten. Der geringste Grad von Echtheit, den wir meist von einer Färbung verlangen, ist Wasserechtheit. Erhitzen steigert meist die Lösungskraft des Wassers, ebenso meist auch die Diffusibilität der Farbstoffe, und so ist es denn *Kaufmann* gelungen, durch siedendes Wasser selbst ziehlgefärbte Bakterien mit Ausnahme der Säurefesten zu entfärben, *Gair* aber Tuberkelbacillen von anderen Säurefesten zu unterscheiden. Stärker ist die Entfärbungskraft des Alkohols und wird die Resistenz diesem Entfärber gegenüber Alkoholfestigkeit genannt. Das Vorhandensein dieser Alkoholfestigkeit erlaubt es z. B., Tuberkelbacillen von anderen Säurefesten, denen sie abgeht, z. B. Smegmabacillen, zu unterscheiden (*Weichselbaum*). Merkwürdigerweise scheint das Optimum der Entfärbung bei 50—60% nach *A. Fischer*, bei 40% nach *Neide* zu liegen, während dieselbe nach oben und nach unten zu sinkt. Dieses Verhalten, das in der Desinfektionskraft verschiedener Alkoholkonzentrationen seine Analogie findet

(*Beyer, Wirgin, Epstein, Weigl, Minervini, Bujwid*), erklärt sich wahrscheinlich durch die koagulierende Wirkung starker Alkoholkonzentrationen, die den Alkohol schlechter in die Bakterienzelle hineingelangen läßt, nachdem sie in den Außenschichten eine undurchdringliche Schicht geschaffen hat. Bei der gewöhnlichen Alkoholentfärbung ist natürlich der Wassergehalt der meist feuchten Schnitte oder Ausstriche zu berücksichtigen, so daß hier auch absoluter Alkohol sich als wirksam erweist, weil er im Substrat verdünnt wird. Auf diese Erscheinung ist die von *Gram* sowie von *Weinrich* ausgesprochene Warnung zu beziehen, bei der *Gram*-Färbung eine Wasserspülung nach der Jodierung zu unterlassen; durch Wasserreste wird dann der nachfolgende absolute Alkohol bis auf 50—70% verdünnt und entfärbt dann zu stark — wird er stärker verdünnt, so entfärbt er zu schwach — daher unsichere Resultate. In der Reihe der homologen einwertigen aliphatischen Alkohole sinkt die Entfärbungskraft mit steigender Anzahl der Kohlenstoffatome (Methyl > Äthyl > Propyl > Amyl), man kann also den Methylalkohol als den energischeren Entfärber verwenden, den Propylalkohol aber, wo es sich um schonende Entfärbung handelt (*Kisskalt*). Energischer als Äthylalkohol wirkt auch Aceton, der vielfach mit jenem in verschiedenen Proportionen gemischt wird (*Nicolle*). Das dreiwertige Alkoholglycerin wird in der Bakteriologie weniger direkt als Entfärber benutzt (wegen seiner Zähigkeit), doch kann seine (mäßige) Entfärbungskraft dazu benutzt werden, um in Farbstofflösungen selbst ihre Färbekraft herabzusetzen und dadurch differenzierte Färberesultate zu erzielen, so z. B. bei der Granulafärbung (*Eisenberg*). Eine ziemlich energische Entfärbungswirkung ist auch dem Formaldehyd eigen (den wir oben als Beize kennen gelernt haben), sie fand Verwendung sowohl zu nachträglicher Differenzierung (für Tuberkelbacillen *Eisenberg*, für Diphtheriegranula *Sommerfeld*), als auch zu simultaner (mit Gentianaviolett *Rübiger*, mit Fuchsin *Eisenberg*). Von aromatischen indifferenten Entfärbern wäre vor allem Anilin zu nennen, das besonders zur Schnittfärbung viel gebraucht wird (*Kühne, Dreyer*). Das salzsaure Anilin wirkt wahrscheinlich infolge hydrolytischer Spaltung als Säure. Endlich wäre hier noch das Saponin zu erwähnen, mit dessen abgestuften Konzentrationen sich schöne Differenzierungseffekte erzielen lassen (*Eisenberg*). Hierbei wäre wahrscheinlich an eine Beeinflussung des gefärbten Substrats durch das Saponin zu denken (Lockerung durch Lipoidbeeinflussung?).

Im Gegensatz zu diesen indifferenten Entfärbern haben wir es bei der Entfärbungsfunktion der Säuren mit einem chemischen Vorgang zu tun, der bei den basischen Farbstoffen (nur bei solchen wirken sie entfärbend) auf der Bildung mehrsauriger Salze beruht, die meist heller gefärbt und leichter diffusibel ausgespült werden. Dazu gehört ein Überschuß von Säure und eine relativ große H-Ionen-Konzentration, wie sie vor allem Lösungen der starken Mineralsäuren bieten, während

organische Säuren meist nur als gute Lösungsmittel die Farbstoffe dem Substrat entziehen. Nach der chemischen Theorie erfolgt auch im letzteren Fall eventuell eine Spaltung der Farbbase-Gewebssäure-Verbindung und wird die erstere von der entfärbenden Säure gebunden. Nach *Nikitin* soll die Entfärbungskraft der Säuren ihrem Dissoziationsgrad, d. h. der jeweiligen verfügbaren H-Ionen-Konzentration proportional sein. Von den Mineralsäuren fanden in der Bakterienfärbung Verwendung: Schwefelsäure, schweflige Säure (*Lustgarten, Matterstock*), Salzsäure, Salpetersäure, salpetrige Säure (stark wirksam nach *Barberio* bei Tuberkelbacillenfärbung), Chlorsäure, Borsäure (*Krefting, Agulhon* u. *Chavannes*), Jodwasserstoffsäure, Jodsäure (*Eisenberg*); von organischen Essigsäure, Milchsäure (*Lesieur, Jacquet* u. *Pintenet*), Pikrinsäure, Citronensäure (als *Essbachsches* Reagens bei *Kronberger*), Oxalsäure (*Matterstock*), Gerbsäure (*Stutzer*). Die Entfärbung wird entweder nach erfolgter Färbung vorgenommen oder aber es wird die Säure der Farblösung zugesetzt, um von vornherein die Ausdehnung und Intensität der Färbung zu begrenzen (Essigsäure bei *Friedländers* Kapselfärbung, bei der Granulafärbung nach *Neisser, Ljubinsky, Trincas, Bie*, Milchsäure bei der Granulafärbung nach *Ficker, Gins* u. a.).

Bei sauren Farbstoffen hingegen kommen b a s i s c h e E n t f ä r b e r in Betracht in Form verdünnter Alkalien (z. B. NaOH bei der *Gasis-Methode* für Tuberkelbacillen), basischer Salzlösungen, Seifenlösungen. Die Erklärung ist hier nicht leicht zu geben, es können zwar analog wie bei den Säuren mehrbasische Salze der betreffenden Farbsäuren gebildet werden, doch unterscheiden sich diese betreffs Löslichkeit und Diffusibilität nicht wesentlich von den einbasischen. Im Sinne der chemischen Theorie würde es sich hier um eine Spaltung der Verbindung Farbsäure—Gewebssbase handeln, wobei die Farbsäure durch die stärkere Affinität der freien Base (bzw. der OH'-Ionen) angezogen wird. Man könnte aber auch eine Quellung des Substrats durch die basischen Entfärber zur Erklärung heranziehen, die zur Lockerung der Farbstoffverbindung führt. Die Entfärbung von basischen Farbstoffen durch Alkalien bei der Tuberkelbacillenfärbung nach *Ziehl, Telemann* (Carbolfuchsin, KOH-Differenzierung) wäre entweder kolloidchemisch oder vielleicht durch Bildung der farblosen Rosanilinbase zu erklären. Außerdem können Färbungen mit Säurefarbstoffen oft mit den oben genannten indifferenten Entfärbern differenziert werden.

Auf Umsetzungen mit den Farbstoffen scheint auch meist die entfärbende Wirkung von S a l z e n zu beruhen. *Gottstein*, der zuerst dieses Entfärbungsprinzip erkannte, führte sie darauf zurück, daß die Farbstoffe durch die Salze quasi ausgesalzen würden (etwa wie Eiweißstoffe) und daß dann diese unlöslichen Niederschläge weggespült würden. Überzeugender und durch direkte Versuche gestützt ist die Erklärung von *Unna*, daß diese „Aussalzung“, die ja tatsächlich an Farbstofflösungen beobachtet werden kann, auf einer Doppelsalzbildung beruht

zwischen Farbstoffsalz und entfärbendem Salz, und da die Affinität zwischen diesem und dem Farbstoff größer ist als zwischen Farbstoff und Gewebe, wird die letztere Verbindung gesprengt. Als solche entfärbende Salze seien genannt: Kochsalz, Natriumsulfat, Magnesiumsulfat, Jodkali, Kaliumbichromat, Magnesiumcarbonat, Alaun (*Gottstein*), Kupfersulfat (*Hiss*), Natriumsulfat (*Carpintero*), Silbernitrat (*Kaufmanns* Kapselfärbung), Eisenchlorid (*de Giacomi* für Smegma- bzw. Syphilisbacillen, *Eisenberg* für Granula- und Tuberkelbacillendifferenzierung, dabei ist natürlich die durch Hydrolyse freiwerdende Salzsäure zu berücksichtigen!), Palladiumchlorid (*Fütterer*). Daneben kommen auch saure und basische Salze in Betracht, deren Wirkungsweise neben der schon angedeuteten in der Abspaltung von H- bzw. OH'-Ionen ihre Erklärung findet. Hier wären zu nennen: Eisenchlorid, Kaliumcarbonat (*Hiss*), Natriumbisulfid (*Czaplewski*). *Unna* bemerkt wohl mit Recht, daß ein Ausbau dieses Differenzierungsprinzips noch viele bedeutungsvolle Resultate liefern könnte.

Eine andere Reihe von Entfärbungsagenzien bilden die oxydierenden Entfärber. Durch ihre Wirkung werden die meisten Farbstoffe in höhere meist heller gefärbte oder ungefärbte Oxydationsstufen überführt, die dann eventuell ausgespült werden. Dasselbe kann auch mit bereits fixierten Farbstoffen oder mit ihren Gewebsverbindungen erfolgen. Auch scheinen manche Oxydatoren Quellung der färbbaren Substrate und dadurch physikalische Lockerung der Farbstoffbindung bewirken zu können. Das älteste Beispiel aus dieser Gruppe ist die Differenzierung der sog. Syphilis(Smegma-)bacillen nach *Lustgarten* mittels Kaliumpermanganat; neuerdings wurde dasselbe von *Eisenberg* in saurer Lösung als Differenzierungsmittel bei Sporen- und Granulafärbungen verwendet — es wirkt übrigens auch bei neutraler oder alkalischer Reaktion. Das Fuchsin wird dabei in einen gelben Körper umgewandelt, das Methylviolett entfärbt. Sodann wäre Chlor zu erwähnen, das in Form *Javellescher* Lauge von *Rondelli* u. *Buscalioni* zur Tuberkelbacillendifferenzierung, von *Trincas* zur Sporendifferenzierung, als Eau de Labarraque für Smegmabacillen von *Brereton* u. *Smith*, in alkalischer Lösung von *Ciaccio* u. *Compari* als allgemeines Entfärbungsmittel, in Form von Antiformin von *Eisenberg* zur Granuladifferenzierung verwendet wurde.

Zu denselben Differenzierungen hat *Müller* das Kaliumpercarbonat verwendet, dem er sehr schonende Entfärbung nachrühmt, ebenso alkalische Wasserstoffsuperoxydlösung. Beide letzteren Agenzien wirken, wie es scheint, nicht direkt auf den Farbstoff, sondern durch Auflockerung des Gewebes (alkalische Reaktion!) und dadurch erleichterte Ausspülung des Farbstoffes (*Unna*). Endlich wäre hier Chinon (in alkoholischer Lösung *Eisenberg*) und das (direkt wirkende) Osmiumtetroxyd (eventuell als Dämpfe) zu nennen, womit *Kirchenstein* die ziehlgefärbten Tuberkelbacillenpräparate differenziert. In gewissem

Sinne gehört hierher die Vorbehandlung von Präparaten mit Osmiumsäuredämpfen nach *Lenartowicz* u. *Potrzebowski*, wodurch die in ihnen enthaltenen Pallidae ihre Färbbarkeit mit Ziehl einbüßen und als farblose Lücken auf stark gefärbtem Grund negativ sich abheben. Hier wird durch Oxydation die ohnehin schwache Färbbarkeit der Pallida auf Null herabgedrückt, die anderer Spirochäten und Bakterien bleibt noch genügend groß. Eine Herabsetzung der Färbbarkeit wird auch bei Kaliumpermanganatbehandlung beobachtet.

Seltener als Oxydation findet Reduktion der Farbstoffe als Entfärbungsprinzip Anwendung. Sie hat natürlich nur dann Zweck, wenn das farblose Reduktionsprodukt nicht leicht wieder an der Luft reoxydierbar ist oder wenn diese Reoxydation durch gewisse Zusätze hintangehalten werden kann. *Knaak* reduziert Methylenblau sowie andere Thiazine und Thiazone mit Schwefelwasserstoff oder Argonin, *Eisenberg* Anilinschwarz mittels erhitzter Ameisensäure, *Carpintero*, *Mayoral* u. *Camero* jodiertes Fuchsin mittels Natriumsulfit.*

Eine vielfacher Variation zugängliche und viel gebrauchte Methode ist die Entfärbung von Farbstoffen durch andere Farbstoffe, u. zw. entweder als reine Entfärbung oder verbunden mit einer Färbung durch den Entfärber (Umfärbung, Substitution). Prinzipiell sind hier zwei Fälle zu unterscheiden: nämlich Entfärbung durch einen Farbstoff gleichen elektrochemischen Charakters (bei Bakterien also meist durch einen basischen), oder durch einen solchen entgegengesetzten Vorzeichens (hier durch einen sauren). Ein Farbstoff gleichen elektrochemischen Charakters kann einen anderen kraft größerer physikalischer bzw. adsorptiver Affinität zum Substrat aus diesem verdrängen, um sich an seiner Stelle zu fixieren. Bekannt sind hier vor allem die Entfärbungen dunkler basischer Farbstoffe durch helle, als deren historisch wichtiges Prototyp die Differenzierung von mit alkalischem Methylenblau gefärbten Tuberkelbacillenpräparaten durch Vesuvin nach *Koch* gelten kann. Dieses differenziert auch ebensolche mit Anilin. Methylviolett gefärbte Präparate (Bonner Militär-Medizinalabteilung), mit Krystallviolett gefärbte Sporenpräparate (*Tribondeau*), ebenso Granulapräparate gefärbt mit Methylenblau nach *Ernst*, *Neisser*, *Falière*, *v. Rovaert*, mit Toluidinblau und *Trincas*, mit Gentianaviolett nach *Gălalescu*, endlich mit Methylenblau gefärbte Gonokokkenpräparate nach *Lanz*. Eine ähnliche Rolle spielt Chrysoidin bei der neuen *Neisser*-schen Körnchenmethode, ebenso andere helle Farbstoffe, wie Safranin, Neutralrot, Rhodamin B, Auramin, Pyronin, Chinolinrot, Acridinorange, Acridinrot, Phosphin, Flavindulin, Chrysolin (*Eisenberg*, *Bozell*). Bei

* *Konrich* entfärbt ziehlgefarbte Tuberkelbacillen ebenfalls mittels Natriumsulfit (D. med. Woch. 1920, S. 741).

diesen entfärbenden Wirkungen kommt viel auf die Reihenfolge und Konzentration der angewandten Farbstoffe, auch auf die Natur des Substrats an; so verdrängt Fuchsin das Malachitgrün bei der Witzschen Sporenfärbung, umgekehrt das Malachitgrün das Fuchsin bei der Tuberkelbacillenfärbung nach der Methode der Bonner Militär-Medizinalabteilung. Es können auch dunkle Farbstoffe gelegentlich zur Verdrängung hellerer angewandt werden, so verdrängt Methylenblau das Fuchsin bei den Methoden von *Semenowicz* und *Marzinowsky* sowie von *Schaeffer*, bei der Tuberkelbacillenfärbung nach *Ziehl* (in Stäbchen von abgeschwächter Säurefestigkeit) und bei der Doppelfärbung von *Babes*, bei der Färbung von Lepra- und Smegmabacillen nach *Marzinowsky* und im Gemisch von *Queyrat* (für *Ducrey-Unnasche* Bakterien).

Bei der Verdrängung basischer Farbstoffe durch saure handelt es sich entweder um eine Konkurrenz der physikalischen (in seltenen Fällen der elektrochemischen) Affinitäten, wie im vorhergehenden Falle, oder aber es werden neutrale Verbindungen gebildet, die im Überschuß des sauren Farbstoffes aufgelöst und dem Substrat entzogen werden. *Kühne* war es, der dieses Prinzip zuerst anwandte, indem er mit Fluorescein, Eosin, Alkaliblau, Lichtgrün S entfärbte, *Pappenheim* empfahl Korallin, *Löffler* Tropäolin 00, v. *Leszczynski* pikrinsaures Kalium, *Eisenberg* Rubin S. Vielfach wurde die Entfärbungskraft saurer Farbstoffe mit jener indifferenten Lösungsmittel kombiniert, so mit Alkohol, Anilin, zuweilen besorgen die sauren Farbstoffe nur die Entfärbung, in manchen Fällen auch die Gegenfärbung (Eosin).

B. Über differentielle Bakterienfärbungen.

Somit hätten wir ungefähr die Hauptbestandteile der Bakterienfärbung kennen gelernt: die Fixation, die Färbung, die Differenzierung, die Gegenfärbung. Beizung sowie Gegenfärbung sind nicht obligate Bestandteile einer Bakterienfärbungsmethode, wohl aber die anderen Prozeduren. Es ist leicht einzusehen, wie groß bei der Mannigfaltigkeit der von der Chemie gebotenen Farbstoffe, Beizen, Fixatoren und Entfärber die Anzahl der möglichen Kombinationen ist. Oft können Fixation und Beizung in einem Akt vereinigt werden (Formalin, Chromsäure, Sublimat, Gerbsäure u. dgl.), in anderen Fällen Beizung und Färbung (alkalische Lösungen von basischen, saure von Säurefarbstoffen) oder Fixation und Differenzierung (alkoholische Farblösungen), Differenzierung und Gegenfärbung (s. oben). Auch die polychromatischen Färbungen können entweder sukzedan oder einzeitig aus Farbgemischen erfolgen. Wir wollen nunmehr die hauptsächlichsten bakteriologischen Differenzierungsmethoden betrachten und uns über ihren Mechanismus Rechenschaft zu geben versuchen.

1. Über die Gram-Differenzierung und ihren Mechanismus.

Wir machen den Anfang mit denjenigen Methoden, die eine färbische Differenzierung verschiedener Bakterienarten anstreben, u. zw. mit der *Gram-Färbung*. Ursprünglich als Differenzierungsmethode für Bakterien gegenüber anderen Gewebsbestandteilen (besonders Kernen) in Schnitten gedacht (*Gram*), gewann sie später ihre dominierende Bedeutung dadurch, daß sie fast alle Bakterienarten ziemlich scharf in zwei große Gruppen zu sondern erlaubt, und daher ihr Resultat zur Artteilweise zur Gattungsscharakteristik mit herangezogen werden kann. Während der Verfasser der Methode selbst sich eines Urteils über ihren Mechanismus enthielt, glaubte *Gottstein* ihr Wesen darin sehen zu müssen, daß das Jodkali als Salz entfärbend wirkt und die verschiedene Echtheit der Färbung diverser Substratbestandteile zu differenzieren erlaubt. *Unna* widersprach dieser Auffassung und zeigte im Anschluß an die Untersuchungen von *Lutz* über Tuberkel- und Leprabacillenfärbung, daß das Wesentliche an der *Gram-Färbung* die Wirkung freien Jods ist, der mit dem Farbstoff (Pararosanilinderivat) eine in Wasser kaum lösliche, alkohollösliche Verbindung eingeht. Diese Verbindung haftet an den grampositiven Arten viel stärker, als an den gramnegativen und hält innerhalb gewisser Grenzen der entfärbenden Wirkung des Alkohols, ja sogar angesäuerten Alkohols (*Gram, Günther*) Stand. Die entfärbende Wirkung des Jodkaliums ist bei dieser Färbungsanordnung eine recht mäßige, es ist daher unrichtig, wenn man, wie es oft geschah, von einer Differenzierung im *Lugolschen* Gemisch sprach, während sie in Wirklichkeit erst durch den Alkohol besorgt wird. Das Jodkali ermöglicht uns im Gemisch die Lösung des Jods in der gewünschten Konzentration. Wie man sich auch die Bindung des Jodfarbstoffs an die Bakterien vorstellen mag, ob im chemischen oder im physikalischen Sinne, die Grundanschauung *Unnas* vom Mechanismus der *Gram-Färbung* wird man wohl akzeptieren müssen.

Weitere Untersuchungen zeigten nun, daß die differentialdiagnostisch so wichtige *Gram-Festigkeit* ein relativer Begriff ist, indem sie in hohem Maße von der Art der Bakterien, ihrem Zustand sowie von verschiedenen technischen Einzelheiten bei der Ausführung der Methode abhängig ist. Es gibt wohl eine Mehrzahl von Arten, die ausgesprochen und unzweideutig positiv oder negativ sind, daneben aber solche, die zweifelhafte Resultate geben können (Gonokokken, Tetanus-, Ödem- und Rauschbrandbacillen, Bac. teras, Diplococcus mucosus Leipzig Stephan, manche Kapselbakterien). Doch auch unter den deutlich positiven widerstehen die einzelnen Arten verschieden lange der Alkoholentfärbung und man kann bei genauer Festsetzung der Färbungsprozedur diese „*Gram-Dauer*“, die zwischen einigen Minuten und 24 Stunden variieren kann, nach *Neide* sowie nach *A. Meyer* und seiner Schule als charakteristisches Artmerkmal betrachten.

Eine besondere Bedeutung messen der *Gram*-Dauer für die Differentialdiagnose zwischen Diphtherie- und Pseudodiphtheriebacillen *Langer* u. *Krüger* bei, die behaupten, daß (nach protrahierter Jodierung und insbesondere bei Färbung mit Anilinwasser-Brillantgrün) die ersteren bereits nach 5—10 Minuten langer Einwirkung von Alkohol entfärbt werden, während die letzteren ihre Farbe festhalten. Nachprüfer haben zwar im Prinzip die geringere Alkoholfestigkeit der Mehrzahl der echten Diphtheriestämme bestätigen können, auf die übrigens früher schon *Scheller* hingewiesen hatte, jedoch finden sie, daß eine sichere und zuverlässige Trennung beider Arten (falls sie als solche anerkannt werden) auf diesem Wege kaum möglich sei, da ausnahmsweise alkoholschwache Pseudodiphtherie- und alkoholfeste Diphtheriestämme vorkommen (*Landau, Schmitz, Münzberg, Stahr, Burckhardt* u. *Enriquez*). Nach *Schmitz* kann der Grad der *Gram*-Festigkeit von Diphtheriestämmen auch mit dem Alter der Stämme sich ändern. Wie bei anderen Artmerkmalen wird man also wohl auch hier dem Grad der Variabilität besondere Beachtung schenken müssen, doch wäre ein weiterer Ausbau der Kenntnis der *Gram*-Dauer als Artmerkmal zweifellos sehr erwünscht.

Bei den zweifelhaften Arten sowie bei manchen negativen dagegen kann man durch verstärkte Färbung oder Beizung eine positive Färbung erlangen, die der normalen Entfärbung standhält. So hat *Kutscher* durch verstärkte Beizung (Phenol neben Anilin) Ödem- und Rauschbrandbacillen, die sonst negativ sich verhalten positiv gemacht, während Gonokokken bei ganz kurzer Entfärbung ihre Färbung behalten (*Hijmans van den Berg*). Anwendung stärkerer Beizen (z. B. konzentrierter Jod-Jodkalilösung), verlängerte Färbungs und Beizdauer, Erhitzen der Farb- oder Beizlösung erhöhen die *Gram*-Festigkeit und erweitern ihren Bereich, umgekehrt wirkt Verstärkung oder Verlängerung der Entfärbung (*Neide*). So z. B. können Diphtheriebacillen mit Salzsäurealkohol entfärbt werden (*Flügge*), Kolibakterien bei erhitzter Jodbeize grampositiv gefärbt werden (*Benians*). Außerdem zeigte es sich, daß auch der biologische Zustand der Bakterien von großer Bedeutung sein kann für ihre *Gram*-Festigkeit. Junge, unter optimalen Bedingungen aufgewachsene Individuen zeigen die größte, alte degenerierte oder durch die Einwirkung von verschiedenen Schädigungen (physikalischen, chemischen, Abwehrvorrichtungen im infizierten Organismus) geschwächte die geringste, die sogar in Negativität umschlagen kann (*Czaplewski, Eisenberg* u. a.).* Dementsprechend können manche negative Arten in jüngsten Stadien schwach positiv erscheinen (*Pyocyaneum, Fluorescens* und *Coli Czaplewski, Eisenberg, Zimmermann*). Auch das Milieu, in dem die Bakterien sich befinden, ist für

* *Panisset L.* (Compt. rend. de la Soc. de biol. 1919, LXXXIII, S. 1318) fand, daß in Gallebouillonkulturen viele Milzbrandstäbchen negativ sich verhalten.

das Differenzierungsergebnis nicht belanglos, im Eiter können sonst negative Arten gefärbt bleiben (*Mills*), ebenso in Rückenmarkssubstanz (*Wilde*). Merkwürdigerweise sollen nach *Warden* sowie *Crabtree* in Eiweißlösung suspendierte weiße Staphylokokken entfärbt werden, gewaschene gramfest sich verhalten. Bestimmte Fixationsarten (Chromsäure, Osmiumsäure) können an Gewebsschnitten eine Positivierung von Negativen bewirken, ebenso nach *Simonini* Imprägnation mit Cerium- und Thoriumsalzen, nach *Eisenberg* auch diejenige mit anderen Metallsalzen (z. B. Chromalaun). Aus alledem folgt der Grundsatz, differentialdiagnostisch nur Färbungen junger, auf guten Nährboden normal gewachsener Kulturen zu verwerten, die unter exakter Befolgung der Standardvorschrift ausgeführt wurden.

Eine Reihe von Modifikationen, die im Laufe der Zeit von verschiedenen Seiten vorgeschlagen wurden, gestattet ebenfalls eine Einsicht in den färberischen Mechanismus der Gram-Methode. An Stelle des Anilins wurde als erste (Verstärkungs-)Beize Phenol (*Nicolle, Dreyer, Löffler, Stephan*), Formalin (*Kilduffe, Monay, Chaussé*), Nelkenöl (*London*), Petroläther (*Ishiwara*) angewandt. *K. A. Atkins* (*Journ. of Bacter.* 1920, V, S. 321—324) läßt das Violett in Anilinsulfatlösung, als Beize verwendet er eine 2%ige Jodlösung in n/10-Natronlauge. Das Anilinsalz erhöht die Stabilität der Violettlösung, bei Einwirkung der alkalischen Beize entsteht daraus Anilin. *Eisenberg, Hausmann, Jensen, Lipp, Smith* haben diese erste Beize überhaupt fortgelassen, die letzteren dafür verstärkte Jodbeize eingeführt. An Stelle des Gentianaviolett wurden vielfach die reineren Methylviolettmarken (6 B, BN *Löffler*, Krystallviolett *Pfeiffer*) eingeführt, *Löffler* hat außerdem Hoffmanns-Violett, Parme, Methylenviolett als geeignet befunden, *Moral-Dulaus* für Aktinomycesfärbung Viktoriablau, *Babes* für dieselbe Safranin, *Langer* für Diphtherie Brillantgrün. Während *Gram* an Schnitten mit Fuchsin und Rubin negative Resultate hatte (vielleicht saure Farbstoffe?) und *Unna* die Behauptung aufgestellt hat, nur Pararosaniline, nicht aber Rosaniline eigneten sich zur Gram-Darstellung der Granula der Tuberkel- und Leprabacillen, konnte *Eisenberg* (an Ausstrichen) zeigen, daß man mit verschiedenen basischen Farbstoffen (roten, blauen, violetten) positive Gram-Differenzierung erreichen kann, wenn auch die farbkraftigen Violette die prägnanteste Differenzierung ergeben. Auch *Reichert* fand später, daß außer Pararosanilinen Rosaniline, Malachitgrünfarben und Auramin zur Gram-Färbung sich eignen, *Langer* hat Brillantgrün mit Erfolg verwendet, *Homberger* wieder Kresylechtviolett. *Kronberger* findet Methylenblau ungeeignet. Das Jod der *Lugol*-Lösung kann man durch frisch entwickeltes ersetzen (*Unna, Stephan*), ebenso durch Jodtinktur (*Eisenberg* entgegen den Behauptungen von *Gram, Unna* und *Hottinger*, man muß nur stärker vorfärben, da mit der Beizung gleichzeitig Entfärbung durch den Alkohol einhergeht) oder durch Jodwasserstoffsäure (*Eisenberg*), nicht

aber durch Jodkali (*Gram*). Brom wirkt nach *Nicollé* ähnlich wie Jod, ebenso das Brom-Bromkaligemisch nach *Mérieux*. *Deussen* fand, daß das *Lugolsche* Gemisch durch Brom- bzw. Jodwasser ersetzt werden kann, nur ist die Hilfe der resultierenden Halogen-Farbstoffverbindung proportional dem Molekulargewicht des angewandten Halogens ($J > Br > Cl$).

Einen prinzipiellen Fortschritt bedeutet die Ersatzmethode von *Claudius*, da sie gezeigt hat, daß eine ganz andere Kombination dasselbe leisten kann, wie die *Gram*-Methode, also Methylviolett ohne Beize, Pikrinsäure als Beize, Chloroform als Entfärber, daß jedoch beide prinzipiell analog konstruiert sind, indem eine unlösliche Verbindung eines dunklen Farbstoffes erzeugt wird, die der Extraktion durch einen indifferenten Entfärber standhält. Als Entfärber werden in den verschiedenen *Gram*-Modifikationen neben Äthylalkohol auch Methylalkohol (*Smith*, *Kisskalt*), Acetonalkohol (*Nicollé*), Nelkenöl (*Babes*), Anilinoxylol (*Chaussé*, *Weigert*) verwendet.

Die soeben skizzierte Auffassung geht aus den Befunden von *Eisenberg* hervor, der zeigte, daß eine Reihe von Beizen, die mit basischen Farbstoffen unlösliche Verbindungen geben, zur *Gram*-Färbung herangezogen werden können an Stelle des Jods. Hierher gehören die verschiedenen schon genannten Nitroderivate α -Naphthol, Gerbsäure, Sublimat, Goldchlorid, außerdem auch lipoidlösliche Beizen, wie Toluidin, Vanillin, Thymol, Menthol, Terpentinöl, Nelkenöl, Origanumöl, Xylenol. Wichtiger noch erscheint der von *Churchman* und *Eisenberg* geführte Nachweis, daß grampositive Bakterien mit basischen Farbstoffen — vor allem mit dunklen — sowohl in lebendfrischem Zustand wie im Trockenpräparat schneller und intensiver sich anfärben und die Farbe auch besser festhalten als gramnegative. Die auf diese Weise erreichbare Differenzierung ist weder prägnant noch scharf genug, um praktisch verwertet werden zu können, sie zeigt aber, daß die *Gram*-Methode nur eine schon vorbestehende Differenz steigert und damit differentialdiagnostisch verwertbar macht. Sodann konnte *Eisenberg* zeigen, daß eine Reihe von Säurefarbstoffen ganz schöne und prägnante *Gram*-Differenzierungen geben ohne Verwendung von Jod oder ähnlichen Beizen (es wird meist die Farblösung angesäuert, da sie sonst nicht färbt), so Wollschwarz sogar ohne jede nachträgliche Differenzierung. Chinablau, Reinblau. Alkaliblau, Wollschwarz 4 B. Guineagrün, Patentblau A mit Differenzierung durch Salzsäurealkohol. Außerdem konnte eine differentielle Färbung mit auf dem Präparat entwickelten neutralen Farbstoffen erzielt werden, indem entweder mit dem basischen Farbstoff vor- und mit dem sauren nachgefärbt wurde oder umgekehrt, je nachdem es die Löslichkeitsverhältnisse erfordern im Sinne der oben mitgeteilten kolloidchemischen Regeln von *Teague* u. *Buxton*. Von basischen Farbstoffen kommen Nachtblau, Viktoriabluu, Gentianablau 6 B, weniger Methylviolett, Fuchsin, Safranin zur Anwendung, von sauren Chinablau, Reinblau, Alkaliblau, Patentblau A.

Palatinschwarz B, Wollschwarz, Wollschwarz 4 B. Zur Differenzierung wurde je nach der Intensität der Färbung gewöhnlicher oder Salzsäurealkohol verwendet, zuweilen wurde dieselbe bereits durch den nachfolgenden sauren Farbstoff besorgt. Endlich konnte eine *Gram*-Differenzierung noch mit einer Entwicklungsfärbung erzielt werden, u. zw. wurde aus einer Mischung von Anilinwasser und Chromsäure Anilinschwarz auf dem Präparat entwickelt und dann mit erhitzter 50%iger Ameisensäure differenziert.

Um das Gesagte kurz zusammenzufassen, haben wir in der *Gram*-Differenzierung eine Methode, die einen dunklen Farbstoff durch Beizwirkung auf den Bakterien zu stärkerer Haftung bringt (erste Verstärkungsbeize), sodann durch zweite Beize ihn noch dunkler und wasserunlöslich macht, endlich durch Differenzierung die in den *Gram*-Negativen nur lockerhaftende Verbindung weglöst. Die Grundlage der Differenzierungsmöglichkeit liegt in der stärkeren Affinität der *Gram*-Positiven für Farbstoffe überhaupt und für dunkle großmolekulare insbesondere, zum Teil wohl auch in der größeren Menge der in den *Gram*-Positiven gebildeten Verbindung. Durch die zweite Beizung erfährt diese Affinitätsdifferenz eine den praktischen Anforderungen entsprechende Höhe und Prägnanz, die dann durch die Differenzierung veranschaulicht wird.

Nachdem wir auf diese Weise einen gewissen Einblick in den färberischen Mechanismus der Reaktion erlangt haben, müssen wir uns die wichtige Frage vorlegen, worauf denn die verschiedene Affinität der beiden Gruppen für Farbstoffe beruht, die in der *Gram*-Färbung am deutlichsten zutage tritt. Die Frage ist umso wichtiger, als nach neueren Forschungen auch im sonstigen biologischen Verhalten beider Gruppen nach manchen Richtungen mehr oder weniger durchgreifende Unterschiede bestehen. Vor allem hat *Brudny* darauf hingewiesen, daß grampositive Arten nach den Befunden von *A. Fischer*, auch *Vahle*, *Grimme*, *Nicolle* und *Alilaire* nicht plasmolysierbar sind, wohl aber die gramnegativen (eine Ausnahme bildet nach *Viehöfer* der plasmolysierbare grampositive *Bac. probatus*?). Die Bilder der Tusche-, Cyanochin- und Collargolmethode (s. weiter unten) bekräftigen diesen Zusammenhang (*Eisenberg*), indem hier die *Gram*-Negativen als ungefärbte Lücken mit dunkler Zentralpartie erscheinen, die Positiven aber diese vermissen lassen. Das dunkle Zentrum entspricht einer Ansammlung von Tusche- bzw. Farbstoff- oder Silberteilchen in der durch plasmolytische Retraktion des Protoplasmas nach den Polen entstandenen Zentraldelle (*Eisenberg*, *Heim*). Die grampositiven Arten sind ferner gegen Pepsin-, Trypsin- und Alkaliwirkung sowie Plasmolyse resistenter (*de Waele*, *Kantorowicz*, *Kruse*, *Bürgers*

und Hösch, Bürgers, Schermann und Schreiber), sie werden von tierischen Seris nicht bakteriolytisch (unter Granulabildung) beeinflusst (bzw. weniger Kruse, Eisenberg, Schallert), dagegen stärker durch Leukocyten (Esch), liefern weniger Anaphylotoxin als *Gram-Negative* (Aronson). Sodann ist von Churchman, Zeiß, Eisenberg gezeigt worden (von Browning u. Gilmour, Isabolinsky u. Smoljan sowie Krumwiede und Pratt, Bernstein u. Löwe, Bronfenbrenner, Jansen, Hall u. Taber, Smyth, Binger, Kondo u. Oguni, Lewis, Petroff bestätigt), daß grampositive Arten im allgemeinen gegenüber der bactericiden und entwicklungshemmenden Wirkung basischer und saurer Anilinfarbstoffe bedeutend empfindlicher sind als gramnegative, was ja mit ihrer oben besprochenen größeren Aufnahmefähigkeit für diese Farbstoffe gut übereinstimmt.* Auch haben neueste (zum Teil noch unveröffentlichte) Untersuchungen von Eisenberg mehr oder minder beträchtliche Differenzen in der Empfindlichkeit beider Gruppen gegenüber einer Reihe anorganischer und organischer Substanzen nachgewiesen, u. zw. scheinen die *Gram-Positiven* gegenüber quellungsfördernden Agenzien resistenter, gegenüber entquellenden empfindlicher zu sein als *Gram-Negative*.** Auch die adsorptiven Eigenschaften beider Gruppen sind verschieden, indem die Positiven von verschiedenen Adsorbentien und Kohlenwasserstoffen stärker adsorbiert werden (Eisenberg, Lang u. Nitsche). Entgegen der stärkeren Benetzbarkeit und Adhäsion der *Gram-Positiven* an Lipoidsolvenzien scheinen *Gram-Negative* nach neueren Untersuchungen von Trillat u. Fouassier durch Wasser besser benetzt zu werden und an diesem auch besser zu adhären, so daß sie leichter von verstäubten Wassertröpfchen mitgeführt werden. Merkwürdig ist auch die Angabe von Küthe, daß zwischen *Gram-Festigkeit* und der Fähigkeit, in sauren Nährböden zu wachsen, ein nicht näher aufgeklärter Zusammenhang besteht. Wie wir sehen, ist also die *Gram-Differenzierung* keine zufällige, aus praktischen Gründen bequeme Methode, sondern sie entspricht weitgehenden Differenzen der beiden Bakteriengruppen, und es erwächst für uns aus dieser Erkenntnis die Aufgabe, die Ursache der Differenzierung in der Konstitution der beiden Gruppen nachzuweisen und sie mit den soeben erwähnten Eigentümlichkeiten in einen Zusammenhang zu bringen. Zu einer endgültigen Aufklärung ist man freilich, wie hier gleich hervorgehoben werden mag, noch nicht gelangt.

Auch hier, wie sonst in der Färbelehre, bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten, eine physikalische und eine chemische, je nachdem man

* Kammerer H. (31. Kongr. f. inn. Med. Wiesbaden 1914, S. 704. Ref. in D. med. Woch. 1914, Nr. 40, S. 1140) fand analoge Differenzen der bactericiden Beeinflussbarkeit durch Hämatoporphyrin, H. Zeiß (Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1920, Orig. LXXXV, S. 291—298) durch Chlorophyll.

** Green u. Westell (zit. bei Zeiß) finden größere Resistenz gegen Arsenik bei *Gram-Negativen*, Rouquier u. Tricoire bei denselben eine große Empfindlichkeit gegen die Desinfektionswirkung von Äther.

dieses oder jenes Prinzip überhaupt anerkennen will, oder man kann auch im Sinne neuerer Erfahrungen beide miteinander zu vereinigen suchen. *A. Fischer*, der erste Vertreter einer physikalischen Deutung, sieht in der *Gram*-Färbung eine Methode zur Differenzierung verschiedener Dichtigkeit des Bakterienprotoplasmas, grampositives Verhalten wird nach ihm durch größere Dichtigkeit, negatives durch geringe bedingt; *Gram*-Färbung an verschiedenen dichten chemischen Eiweiß-fällungen wird als Beweis angeführt, es sollen nämlich dichtere und grobkörnigere Albumosefällungen grampositiv sich färben lassen, feinkörnigere Fällungen derselben Albumose aber entfärbt werden (von *Deussen* nicht bestätigt). Dieser Meinung schloß sich neuerdings *Kruse* an, der glaubt, daß die größere Dichtigkeit des Protoplasmas der *Gram*-Positiven auch ihre Resistenz gegen Verdauung, Alkalien und Plasmolyse erklärt, indem sie eine relative Impermeabilität des Protoplasten bedingt. Freilich ist dann nicht einzusehen, wieso Farbstoffe und Beizen besser in sie permeieren sollen, was tatsächlich der Fall ist; auch wurde bis jetzt Plasmolyse auf relative Impermeabilität, ihr Fehlen auf Permeabilität der betreffenden Zellen zurückgeführt. Der Erklärungsversuch von *Brudny* geht von der Tatsache aus, daß grampositive Arten meist nicht plasmolysierbar, also nach *A. Fischer* permeabel, gramnegative plasmolysierbar, also (relativ) impermeabel sind. Die Färbungsdifferenzierung soll auf der verschiedenen Permeabilität der beiden Gruppen für Jod beruhen; wo dieses in größerer Menge hineingelangt, wird mehr von der unlöslichen Jodfarbstoffverbindung gebildet, deren Retention die Positivität ausmacht. Der größeren Dichtigkeit des Protoplasmas der *Gram*-Positiven sollen nach *Brudny* auch weitere Intermicellarräume entsprechen, die eine größere Farbstoffaufnahme ermöglichen. Wenig einleuchtend ist die Auffassung von *A. Fischer* (nicht identisch mit dem vorhin genannten), der dem Alkohol die Hauptrolle bei der Methode zuspricht. Derselbe soll die Intermicellarräume der Bakterien abdichten und dadurch bei den *Gram*-Positiven das Heraus-treten der Jodfarbstoffverbindung verhindern (warum nur bei diesen?).

Die Vertreter der chemischen Auffassung betonen demgegenüber auch die Bedeutung eines besonderen chemischen Substrats für den Ausfall der *Gram*-Färbung. Eine solche Annahme lag schon implicite in der oben besprochenen *Unnaschen* Theorie, die eine Tripelverbindung: Farbstoff—Beize—Substrat annahm. Dieses Substrat muß bei den zwei Gruppen verschieden sein, daher auch die verschiedene Festigkeit der Bindung, die bei den Negativen schon durch Alkohol gesprengt werden kann. *Bergey* spricht sich nur allgemein für die Bedeutung der chemischen Beschaffenheit der Bakterien aus. Zu dieser Anschauung bekennt sich auch *Grimme*, der den Versuch machte, das in Betracht kommende Substrat zu eruieren. Die Schleimschicht (Außenschicht der Membran) soll das Zustandekommen der Färbung nicht beeinflussen, ebensowenig die Membran selbst, die gramfeste Substanz wäre also im

Cytoplasma zu suchen. Durch heiße Salzsäure, 1%ige Kalilauge, 5%ige Soda, Pepsin- und Trypsinverdauung gelang es ihm nicht, die *Gram*-Positivität zu vernichten. Auf cytoplasmatische Bestandteile als Substrat der *Gram*-Festigkeit verweisen auch die Versuche von R. u. W. Albert, wonach die *Gram*-Festigkeit der sterilen Dauerhefe durch Autolyse zum Verschwinden gebracht wird (endotryptische Selbstverdauung). Nach Trommsdorff sowie Meisenheimer ist getrockneter Hefepreßsaft gramnegativ, das *Gram*-Substrat scheint also an den Heferückstand gebunden zu sein. Nach Cohn nimmt die *Gram*-Festigkeit der Kleinschen tierpathogenen Hefe unter ungünstigen Lebensbedingungen auch im Tierkörper ab, wahrscheinlich durch Auslaugung des gramfesten Substrats. Beim Hungern auf Gipsblöcken wird die Hefe ganz gramnegativ, weil hier das autolytisch aufgebrauchte Substrat nicht wiederersetzt werden kann. Guerbert, Mayer u. Schäffer glauben, daß der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, Cerebrosiden und Phosphatiden die *Gram*-Festigkeit bedingt, weil sie an diesen Körpern in vitro grampositive Färbung erzielen konnten, während Neutralfette versagten. Durch Behandlung mit Chrom-Osmium-Gemischen konnte die *Gram*-Festigkeit von Bakterien zum Verschwinden gebracht werden, was mit der Oxydationsempfindlichkeit dieser Körper übereinstimmen würde. In den Lipoiden sehen ebenfalls das Substrat der *Gram*-Festigkeit Dreyer, Kriegler u. Walker.* Weniger glücklich ist die Hypothese von Aronson, der den Fettgehalt der Bakterien für ihre *Gram*-Festigkeit verantwortlich macht auf Grund der Beobachtung, daß man die *Gram*-Positiven mit Benzoylchlorid ihrer Festigkeit berauben kann (Aronson vergißt, daß dasselbe Salzsäure abspaltet!). Er stellt sich vor, daß bei der Beizung die methylviolettgefärbten *Gram*-Positiven von der wässerigen Beize dank ihrem Fettgehalt nicht benetzt werden und deshalb ihre Farbe behalten, während die Negativen die Beize eintreten lassen, die nun mit dem Farbstoff ein Additionsprodukt bildet, das nachträglich vom Alkohol herausgespült wird. Diese Hypothese stimmt nicht zu der Tatsache, daß Fetteinschlüsse von Bakterien gramnegativ sind sowie daß auch ohne Beizen *Gram*-Differenzierung erhalten werden kann, auch ist die Behauptung, Fett könnte kein Jod aus wässriger Lösung aufnehmen, nicht richtig. Endlich müßte man im Sinne dieser Hypothese erwarten, die positiven Arten im reinen Ton des Methylviolett gefärbt zu sehen, während sie in Wirklichkeit den schwarzblauen der Jod-Violettverbindung aufweisen. Über andere Autoren, die ebenfalls fettartigen Körpern eine entscheidende Rolle im Mechanismus der *Gram*-Festigkeit zusprechen wollen, s. weiter unten.

* Nach Stoeltzner W. (M. med. Woch. 1919, Nr. 25) soll die *Gram*-Festigkeit der Tuberkelbacillen durch die im Tuberkelwachs enthaltenen Wachsester und freien hochmolekularen Fettsäuren bedingt sein. Diese Stoffe sind auch in vitro gramfest; durch Jodierung werden dieselben nach Violett-färbung alkohol-unlöslich.

Hatte bereits *A. Fischer* auf Grund seiner Modellversuche an Albumosegranulis den Kolloidzustand von Eiweißstoffen als Grundlage der Differenzen im *Gram*-Verhalten ausgesprochen, so haben in neuester Zeit zwei Forscher diesen Weg weiter verfolgt. Der eine von ihnen, *Hottinger*, stellt eine kolloidchemisch-optische Erklärung der *Gram*-Färbung auf. Die Annahme von Unterschieden der Permeabilität der *Gram*-Positiven und -Negativen wird verworfen, ebenso die Annahme von Unterschieden der Plasmadichte (*Kruse*) und die Bedeutung von fettartigen Körpern.

Das Substrat der *Gram*-Färbbarkeit sieht *Hottinger* im Chromatin, das zum größten Teil aus Nucleoproteiden besteht. Diese letzteren sind nun freilich sowohl im Protoplasma der Positiven, als auch in demjenigen von Negativen enthalten, auch ist nicht der Gehalt an Nucleoproteiden für das *Gram*-Verhalten maßgebend, sondern lediglich die Größe und Zahl der sich färbenden Micellen, d. h. „die Größe der Emulsionskörnchen der Nucleoproteide definiert das Problem der *Gram*-Färbung“. Sind die Körnchen klein (Durchmesser kleiner als 0.1μ) und die Intermicellarräume relativ groß, so wird das gefärbte Bild durch Beugungserscheinungen ausgelöscht und die betreffenden Bakterien — die *Gram*-Negativen — erscheinen farblos, bzw. hauchartig violett. Sind die Körnchen größer und ihre Zwischenräume enger — das soll für die Positiven zutreffen — so erscheinen die Bakterien in voller Färbung. Die mit dem Altern der Bakterien verbundenen Änderungen des *Gram*-Verhaltens sollen auf Änderungen des Dispersitätsgrades der Nucleoproteide beruhen, ebenso die Aufhebung der *Gram*-Festigkeit durch tryptische Verdauung auf Erhöhung ihrer Dispersität durch Peptisation. Auch die größere Trypsinresistenz der *Gram*-Positiven wird auf die grobdisperse Struktur ihrer Nucleoproteidteilchen zurückgeführt. Diese leider etwas konfus ausgedrückte Hypothese dürfte — abgesehen davon, daß für eine kolloidchemische Differenz der beiden Gruppen keine Beweise vorgebracht werden können — der Kritik kaum standhalten, denn es wäre bei diesem Sachverhalt nicht gut einzusehen, wieso die *Gram*-Negativen bei gewöhnlichen Färbungen überhaupt zur Anschauung gebracht werden können.

In einer ausführlichen, gewissenhaften und an interessanten Beobachtungsdetails reichen Arbeit sieht *Deussen* ebenfalls in den Nucleoproteiden das maßgebende Substrat der *Gram*-Färbung. Modellversuche und Färbung von verschiedenen Fettemulsionen zeigten keine *Gram*-Färbbarkeit, auch keinen Einfluß der Jodzahl der Fette auf ihre Färbbarkeit. Gramnegativ verhielten sich auch Hühnereiweiß, Casein, Schalenhaut des Hühnereis, positiv dagegen Nucleinsäure und Nuclein sowie verschiedene als nucleinreich bekannte Gebilde wie Zellkerne der Zungenepithelien, Zellkerne und Kernteilungsfiguren von Erbsenkeimen, die Köpfe mancher Spermatozoenarten. Auch das Verhalten der

Nucleine gegen Säuren und Alkalien entspricht der Beeinflussung des *Gram*-Verhaltens durch dieselben Agenzien. Zur Arbeit von *Deussen* wäre kritisch zu bemerken, daß dieselbe in vorliegender Form es unterlassen hat, den wichtigsten Teil des *Gram*-Problems zu erklären, d. h. die Frage zu beantworten, worin der Unterschied zwischen *Gram*-Positiven und -Negativen besteht. Da nach den vorhandenen Analysen der Bakterien Nucleoproteide auch in *Gram*-Negativen in größerer Menge vorhanden sind, müßte man die Frage beantworten, welche qualitativen Differenzen der Nucleoproteide verschiedener Bakterienarten ihr verschiedenes *Gram*-Verhalten bedingen. Im großen und ganzen vertritt *Deussen* einen exquisit chemischen Standpunkt, wenn er auch die Mitwirkung physikalischer Faktoren nicht ganz leugnet. Als Vertreter der chemischen Theorie sei endlich noch *Deycke* genannt, der geneigt ist als Substrat der *Gram*-Festigkeit (wenigstens bei Tuberkelbacillen) Eiweißkörper anzusprechen.

Eine andere Reihe von Erklärungen versucht physikalische und chemische Momente in verschiedener Weise zu vereinigen. *Nikitine* hat verschiedene Fettlösungsmittel vergebens zur Extraktion des gramfesten Substrats benutzt, auch durch Formalin oder Erhitzen auf 60—180° (widerspricht den Erfahrungen von *Gabritschewsky* und *Eisenberg*) gelang es ihm nicht die *Gram*-Festigkeit zu vernichten, wohl aber durch verschiedene Säuren und Basen sowie durch Papayotinverdauung. Interessant ist die Beobachtung, daß die künstlich der *Gram*-Festigkeit beraubten Bakterien durch die Einwirkung von *Löffler*-Beize (Tannin oder Formalin allein wirkungslos) dieselbe wieder erlangen. (Diese letztere Beobachtung wird von *Deussen* bestritten, während die anderen bestätigt werden.) Aus seinen Beobachtungen zieht *Nikitine* den Schluß, daß es physikalische, aber durch chemische Faktoren bedingte Veränderungen der Bakterien sind, die den Umschlag des *Gram*-Verhaltens bedingen. Er denkt vor allem an Veränderungen der Bakterienmembran-Aufquellung bzw. herabgesetzte Permeabilität und die Beobachtung, daß an reiner Cellulose die Erscheinungen der *Gram*-Festigkeit und ihrer Beeinflussung reproduziert werden können, legt ihm die Frage nahe, ob es nicht der Cellulosegehalt der Bakterienmembran ist, der die *Gram*-Festigkeit bedingt. *Cedercreutz* hält im Anschluß an die von *Auclair* u. *Paris* geäußerte Auffassung der Säurefestigkeit die chemische Zusammensetzung der Bakterien, u. zw. aus Fett, Stärke, Hemicellulose und gewissen Eiweißkörpern für die Grundlage der *Gram*-Festigkeit, zugleich aber „noch eine spezielle, zusammengedrungene physikalische Natur der Bakterienzelle“, die sowohl Färbung als auch Entfärbung erschwert. (Die Schwierigkeit der Färbung trifft nicht zu, vielmehr ihr Gegenteil.) Er folgert dies aus seinen Beobachtungen, daß manche gramnegative Kokken in Fett, Eiweiß oder Stärkekleister ausgestrichen sich positiv verhalten, andererseits *Gram*-Positive durch Pepsin-, Trypsin- oder Papayotinverdauung negativ werden.

Eisenberg stützt sich vor allem auf die Feststellung, daß die grampositiven Arten im Gegensatz zu den gramnegativen nicht plasmolysierbar sind, nach der Auffassung von *Fischer* also als permeabel zu gelten hätten. Hiermit stimmt die direkte Beobachtung, daß Farbstoffe in dieselben leichter eindringen und stärker gespeichert werden, sowie daß sie dementsprechend von ihnen viel stärker bactericid beeinflußt werden als die anderen. Da die Permeabilität vor allem durch die Eigenschaften des Ektoplasmas (der Rindenschicht des Cytoplasmas) bedingt wird — eine als durchlässig zu denkende Membran besitzen ja beide Gruppen — vermutet *Eisenberg* in ihnen den Hauptfaktor des *Gram*-Verhaltens. Es gelang ihm mit Hilfe gewisser Modifikationen der *Claudius*- und *Gram*-Methode, das Ektoplasma elektiv positiv darzustellen, was für eine besondere Affinität desselben zu den komplexen Farbstoffverbindungen sprechen würde. Zur Erklärung der verschiedenen Permeabilität und Speicherungsfähigkeit der *Gram*-Positiven und *Gram*-Negativen stellt er die Hypothese auf, daß der Gehalt an Lipoiden bzw. Lipoid-eiweißverbindungen es ist, der beide Eigenschaften bedingt. Die von verschiedenen Autoren zur Umstimmung der *Gram*-Festigkeit benutzten Einwirkungen beeinflussen sowohl Lipotide als auch Proteine, so starkes Erhitzen (*Gabritschewsky*, *Trommsdorff*, *Eisenberg*), oxydierende Agenzien (*Guerbert*, *Mayer* u. *Schäffer*, *Aronson*, *Nikitine*, *Eisenberg*), Verdauungsfermente (*Nikitine*, *Cedercreutz*, *Deussen*), ultraviolette Bestrahlung (*Cernovodeanu* u. *Henri*), Extraktionsmittel (*Reichert*, *Eisenberg*, *Jobling* u. *Petersen*, *Tamura*). Da die Haftung der Farbstoffe durch Adsorption seitens der Eiweißkörper und Lipotide bzw. ihrer Verbindungen zustande kommt (*Löwe*), wird man bei den Positiven einen größeren Gehalt an diesen Stoffen oder ihre verschiedene Zusammensetzung vermuten dürfen. Wurde dank der größeren Permeabilität und Bindungsaffinität mehr Farbstoff aufgenommen und gebunden, so kann nachträglich auch das Jod vielleicht besser aufgenommen werden, es wird folglich mehr von der Jod-Farbstoffverbindung gebildet, und dieselbe dann bei der Differenzierung stärker zurückgehalten werden.

Eine Bestätigung der von *Guerbert*, *Mayer* u. *Schäffer*, *Eisenberg*, *Dreyer*, *Kriegler* u. *Walker* angenommenen Bedeutung der Lipotide für die *Gram*-Festigkeit lieferten die Befunde von *Tamura*, der aus Diphtheriebacillen ein Phosphatid extrahierte, das als grampositiv sich erwies, während die extrahierten Bakterienleiber ihre Festigkeit eingebüßt hatten. Auch die Art der Lipotide ist sicher von Bedeutung und variiert bei verschiedenen Bakterienarten, so z. B. hat *Tamura* die aus einem gramnegativen Wasserbaeillus isolierten Lipotide nicht gramfest gefunden. In Bestätigung seiner Angaben konnte *Reichert* durch verschiedene Lipoidextraktionen Diphtherie- und Milzbrandbacillen ihre *Gram*-Festigkeit entziehen, schwieriger ging es bei Staphylokokken. Diese Befunde ebenso wie negative Resultate mancher Extraktionsversuche zum Teil bei anderen Bakterienarten (*Nikitine*, *Grimme*, *Aronson*,

Eisenberg, Deussen) legen den Gedanken nahe, daß der Mechanismus der *Gram*-Färbung vielleicht nicht in allen Fällen ganz derselbe zu sein braucht, besonders, wenn er das Gesamtergebnis einer Reihe von Faktoren ist. Daraufhin wird es z. B. als plausibel erscheinen, daß nach *Nikitine* die durch Säure- oder Alkalieinwirkung verschwundene *Gram*-Festigkeit durch Behandlung mit *Löffler*-Beize (Koagulation?) restituiert werden kann. Auf eine ebensolche Beeinflussung scheint die interessante Beobachtung von *Simonini* zurückzuführen zu sein, der bei Wachstum auf mit Cer-, Thor- und Lanthansalzen versetzten Nährböden gramnegative Arten positiv werden sah, sowie die analoge Feststellung von *Eisenberg*, daß *Gram*-Negative durch Behandlung mit verschiedenen Metallsalzen (besonders Chromalaun) zum Teil positiv werden. Endlich wird es nicht belanglos sein anzuführen, daß nach *Lenhoff* die der *Gram*-Färbung ganz analoge Fibrinfärbung nach *Weigert* ebenfalls auf dem Lipoidgehalt (ungesättigte Fettsäuren) des Fibrins beruht und daß durch Ätherextraktion dem Fibrin die *Weigert*-Festigkeit entzogen werden kann. Endlich wird es am Platze sein zu erwähnen, daß nach *Jobling* u. *Petersen* die Trypsinresistenz der Bakterien an eine Lipidhülle gebunden sein soll, daher auch ihre Größe proportional dem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren (bzw. an Lipoiden, die ungesättigte Fettsäuren führen). Die höhere Trypsinresistenz ebenso wie die *Gram*-Festigkeit der Positiven soll nach diesen Autoren darauf beruhen, daß bei ihnen die Lipide fester an Eiweißkörper gebunden sind, daher auch schwieriger extrahierbar sind als bei den *Gram*-Negativen.

Als neuester Vertreter dieser kombinierten chemisch-physikalischen Erklärungsweise wäre *Gassner* zu nennen. Dieser Forscher fand in Bestätigung bereits erwähnter Befunde von *Churchman*, *Zeiß*, *Eisenberg* und anderen, daß ein von ihm für die Elektivzüchtung verwandter Azofarbstoff, das Metachromgelb (ebenso einige nächstverwandte Azofarbstoffe) *Gram*-Positive elektiv beeinflusst, während seine Wirkung auf *Gram*-Negative eine sehr geringfügige ist. Die Erklärung dieser spezifischen Desinfektionswirkung auf Grund der chemischen Theorie erscheint *Gassner* unzulässig, man müßte denn die unwahrscheinliche Annahme machen, daß die Eiweißstoffe des Protoplasmas der Positiven den Farbstoff chemisch zu binden vermögen, während denjenigen der Negativen diese Eigenschaft abgesprochen werden müßte. Um die Differenz zu erklären, stellt nun *Gassner* die Hypothese auf, daß sowohl die Metachromgelb-Empfindlichkeit der lebenden, als auch die *Gram*-Festigkeit der toten *Gram*-Positiven auf der Permeabilität der ihnen eigenen kolloidalen celluloseähnlichen Membran beruhen. In feuchtem Zustand soll dieselbe Farbstoffe sowie Jod in die Bakterienzelle intrameieren lassen, in trockenem wie manche Samenhüllen für Alkohol undurchlässig sein, daher ihre *Gram*-Festigkeit. Bei den Negativen soll nach dieser Hypothese die Membran nicht aus celluloseähnlicher Substanz bestehen, und in lebendem Zustand semipermeabel, also für Salze

und Farbstoffe undurchlässig sein — daher ihre Farbstofffestigkeit — im toten aber permeabel, u. zw. sowohl für Farbstoff als auch für Alkohol, daher die fehlende *Gram*-Festigkeit. Ganz abgesehen davon, daß unsere Kenntnisse über die chemische sowohl als physikalisch-chemische und kolloidchemische Beschaffenheit der Bakterienmembran höchst dürftige sind, läßt die Hypothese sich kaum mit manchen Beobachtungen in Einklang bringen, so mit der primären stärkeren Färbbarkeit der Positiven auch in abgetötetem Zustand (*Churchman, Eisenberg*), mit der Möglichkeit der Differenzierung bei einfacher Färbung mit Wollschwarz (ohne Entfärbung), sowie mit der *Gram*-Differenzierung durch Anilinschwarz, wobei ebenfalls kein Alkohol oder ähnlicher indifferenten Entfärber verwendet wird (*Eisenberg*). Gegen die ausschließliche ursächliche Rolle von Membranen bei der *Gram*-Festigkeit spricht jedenfalls die seit längerer Zeit bekannte stärkere *Gram*-Festigkeit mancher Zellbestandteile der *Gram*-Positiven bei stärkerer Entfärbung oder in sonst lädierten Zellen (*Braem, Nowak, Eisenberg*) sowie dieselbe Erscheinung bei Hefezellen (*Henrici*); es ist ja kaum einzusehen, weshalb von einer gemeinsamen Membran umschlossene Gebilde sich bei der Entfärbung verschieden verhalten sollten, wenn der Membran die entscheidende Rolle zukäme. Dasselbe gilt von der höheren *Gram*-Festigkeit der Volutingranula der Diphtheriebacillen im Vergleich zum restlichen Bakterienleib. Endlich wäre noch zu bemerken, daß nach Untersuchungen von *Thurn* das in der Bakteriologie übliche Antrocknen der Bakterien, eine gemäßigte Hitzefixation und die gewöhnlichen Färbeprozeduren nicht imstande sind, alle Bakterien abzutöten.

Daß nicht allein die chemische Zusammensetzung maßgebend ist, sondern auch die Struktur dabei eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt, folgert aus seinen interessanten Versuchen *Benians*. Er zeigte, daß zerriebene grampositive Bakterien- und Hefesubstanz nicht gramfest ist und daß gramgefärbte Bakterien durch Zerreiben ihre Alkoholfestigkeit einbüßen. Daraus folgert er die Notwendigkeit einer schützenden Wirkung der Bakterienmembran(?) zur Erklärung der *Gram*-Festigkeit. Dieselbe soll durch Jod- bzw. Pikrinsäure für Alkohol impermeabel werden; warum nur bei den *Gram*-Positiven, wird nicht erklärt. Es bliebe noch zu zeigen, daß beim Zerreiben nur mechanische, nicht aber chemische oder thermische Einwirkungen in Betracht kommen. Hefepreßsaft verhält sich, wie schon erwähnt, gramnegativ, der Preßrückstand aber positiv (*Trommsdorff und Meisenheimer*). Daß seine Hypothese nicht alle Erscheinungen der *Gram*-Festigkeit restlos erklärt, verhehlt sich auch *Benians* selbst nicht, wie übrigens im allgemeinen festgestellt werden muß, daß eine voll begründete und einwandfreie Deutung noch aussteht. Gegen die ausschließliche Bedeutung der chemischen Zusammensetzung des *Gram*-Substrats spricht wieder die Tatsache, daß chemisch ganz verschiedene Substrate *Gram*-Festigkeit aufweisen können (Hornssubstanz, verkalkte Gewebe, gewisse Harn-

zylinder *Babes*, Fibrin *Lenhoff*, verholzte pflanzliche Membranen *Gassner*, Zellkerne, Nucleolen, Mitosen, γ -Granula der Leukocyten, das Hornlager der Epidermis, Fettkugeln nach *Günther*, nach anderen zweifelhaft. *Negri*-Körperchen sowie Nucleolen der Pyramidenzellen nach *Carpano*).

2. Färbung der Säurefesten. In färberischem Sinne ist die Säurefestigkeit als die Fähigkeit gewisser Substrate zu bezeichnen, eine Färbung trotz Säureeinwirkung zu behalten. Säurefest sind nun in diesem Sinne gewisse Chitingebilde (Schalen von Bandwurmeiern, von Daphnien, Psorospermien, Lycopodiumkörner, Insektenpanzer *Helbing*), das Hornlager der Haut, gewisse Erythrocytenbestandteile, Haare, *Charcot-Leydensch*e Asthmakristalle (*Eisenberg*), Askosporen mancher Hefen (*Beauverie*), Bakteriensporen, das Protoplasma gewisser grampositiver Arten, vor allem aber und unter den Bakterien am stärksten eine Gruppe auch biologisch nahestehender Arten, die nach der Säurefestigkeit ihren Namen führt. Auch innerhalb dieser Gruppe ist der Grad der Eigenschaft verschieden ausgebildet bei den einzelnen Gliedern, ebenso die Alkoholfestigkeit, was zur Differentialdiagnose dieser Arten untereinander Verwendung findet. Je ausgesprochener die Säure- und Alkoholfestigkeit, desto schwieriger erfolgt meist die Färbung und erfordert meist die Mitwirkung von Beizen; ist die Färbung aber einmal erfolgt, so hält sie nicht nur der Säure und dem Alkohol, sondern auch anderen entfärbenden Agenzien Stand.

Während manche Säurefeste schon bei gewöhnlicher Färbungsweise genügend gefärbt werden können, erfordert bei Tuberkel- und Leprabacillen die Darstellung mit gewöhnlichen Farblösungen von Fuchsin, Gentianaviolett, Safranin, Dahlia, Methylgrün, Malachitgrün längere Zeit oder Erwärmen der Farblösung. Methylenblau färbt dabei nur aus alkoholisch-wässriger Lösung, Vesuvin versagt ganz (*Wesener, Lichtheim, de Giacomi, Baumgarten, Ehrlich, Prior, Petri, B. Fränkel*), auch färben sich bei gewöhnlicher Färbung nicht alle Tuberkelbacillen (*Waledinsky*). Die meistgebräuchlichen Färbungsmethoden für Säurefeste bedienen sich verstärkter Beizenfärbungen, als Farbstoffe wurden meist Fuchsin, Gentiana- oder Methylviolett, seltener Methylenblau, Nachtblau, Viktoriablauf oder andere basische Farbstoffe (Methylengrün, Malachitgrün, Safranin, Neufuchsin, Bindscheidl's Grün, Indazin, Amethystviolett, Echtneutralviolett, Fuchsia, Capriblau, Brillantkresylblau, Phenylenblau, Rhodamin B, Pyronin, Indulin-Scharlach, Acridinrot, Thionin, Toluidinblau, Gentianin, Äthylenblau, Azur I nach *Eisenberg*, mit Malachitgrün und *Giemsa*-Blau nach *Löffler* färbt *Michaelides*). Als Beizen führen die verschiedenen Methoden an: Phenol, Xylenol, Anilin, Toluidin, Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Formaldehyd, Vanillin, Chloroform, Petroläther, Nelkenöl, Terpentinöl, Thymen, Naphthol, Pikrinsäure, Kreosot, Campher, Menthol, Borsäure, Sublimat, Goldchlorid, Kalilauge, Ammoniumcarbonat, Borax, Natriumarsenit, Pyridin, Chi-

nolin. Verschiedenartig sind auch die Entfärbungsagenzien, die dann die Differenzierung der Säurefesten von anderen Bakterien und auch vom Milieu besorgen. Ihre Wahl und Konzentration richtet sich, wie bei den Entfärbern überhaupt, nach der darzustellenden Art und nach dem erwünschten Differenzierungsgrad. Wir wissen, daß die Säurefesten beim Altern in den Kulturen, ebenso auch im infizierten Organismus wahrscheinlich infolge der Einwirkung seiner Abwehrkräfte ihre Festigkeit mehr oder weniger einbüßen können, ebenso, daß ganz junge Tuberkelbacillen noch nicht ihre volle Säurefestigkeit aufweisen (*Marmorek, Klein, Olschanetzky, Karlinski, Treuholtz, Ziehl, Ehrlich, Krylow*), endlich, daß junge sowie alte Tuberkelbacillen eine verringerte Alkalifestigkeit zeigen (*Dold, Eisenberg*). Will man auch solche Individuen zur Darstellung bringen, so muß man mildere Entfärbungsprozeduren anwenden (oder die Färbung verstärken), wobei man natürlich mit der Herabsetzung der färberischen Anforderungen Gefahr läuft, auch andere Bakterien außer den Säurefesten noch gefärbt zu bekommen. Am meisten gebraucht wurden starke Mineralsäuren in verschiedenen Konzentrationen neben Alkohol oder zusammen mit ihm: wollte man schonender entfärben, so nahm man organische Säuren, verschiedene Salze (Eisenchlorid sowie andere oben genannte), Säurefarbstoffe (Corallin, Fluoresceïn, Tropäolin), andere basische Farbstoffe (Vesuvín, Neutralrot, Methylenblau), neutrale (Methylenblaupikrat nach *Grosso*) oder endlich siedendes Wasser („Kochfestigkeit“ *Preis, Gair*). Außerdem können zur Entfärbung oxydierende Substanzen dienen (Kaliumpercarbonat, Kaliumpermanganat, alkalisches Wasserstoffsuperoxyd), Alkalien (*Ziehl, Gasis, Telemann*), Formalin (*Eisenberg*) sowie das reduzierende Natriumsulfit (*Carpintero, Mayoral u. Gamero*).* Ein besonders noch nicht genau erklärtes Prinzip liegt zwei Umfärbungsmethoden von *Eisenberg* zugrunde. Nach einer wird das mit erhitztem Formol-Carbofuchsin gefärbte Präparat mit Säurealkohol differenziert, nach der anderen wird das mit erhitztem Carbofuchsin gefärbte Präparat mit Chromsäurelösung nachbehandelt. In beiden Fällen erscheinen Tuberkelbacillen violett, andere Bakterien sowie der Hintergrund rot. Bemerkenswert ist die Methode von *Gibbes*, die Färbung der Tuberkelbacillen und Gegenfärbung des restlichen Gewebes und der Nichtsäurefesten gleichzeitig mit einem Gemisch von Fuchsin und Methylenblau in Anilinwasser besorgt und mit Methylalkohol differenziert. *Rindfleisch* färbt und differenziert zugleich in wässrigem salpetersauren Alkohol. *Rondelli u. Bascalioni* benutzen zur Differenzierung und Gegenfärbung zugleich *Javellesche Lauge, Gabbet* sowie neuerdings *Cépède* kombinieren Methylenblauachfärbung mit Säuredifferenzierung. Eine Färbung mit sauren Farbstoffen ist ebenfalls möglich. *Wesener* hat mit angesäuertem Eosin Tuberkelbacillen dargestellt, *Gasis* unter Zuhilfe-

* Auch *Konrich*, D. med. Woch. 1920, S. 741.

nahme von Sublimatbeize ebenfalls mit Eosin, *Eisenberg* auch mit anderen Farbstoffen der Phthaleingruppe, besonders schön mit Sublimatcyanosin. Als Entfärber wurden in diesen Fällen Kalilauge und Jodkali verwendet. *Wolters* konnte unter entsprechender Beizung (Vanadinchlorid und Aluminiumchlorid) Leprabacillen mit Hämatoxylin darstellen, *Camus* u. *Pagniez* färben Tuberkelbacillen mit Kupferhämatoxylin. Mit anderen Säurefarbstoffen werden nach der *Gasis*-Methode nur ausnahmsweise Färbungen der Tuberkelbacillen erzielt (Säurefuchsin). Das eigentlich schon außerhalb der Färbemethoden liegende Prinzip der Silberimprägnation wendet *Yamamoto* an; Tuberkelbacillen werden dabei schwarz, Leprabacillen bleiben ungefärbt als helle Lücken auf schwarzem Grunde. *r. Betegh* erzielt eine elektive Versilberung der Tuberkelbacillen-Granula, wobei der restliche Bacillenleib farblos bleibt.

Zur Differentialdiagnose der verschiedenen Arten der Säurefesten untereinander wird meist der verschiedene Grad ihrer Säure- und Alkoholfestigkeit, ihre verschiedene Färbungsresistenz und ihr Verhalten gegen Fettlösungsmittel herangezogen. So färben sich Leprabacillen leichter in gewöhnlichen Farblösungen auch ohne Beizen und Erwärmen, sind aber auch weniger säurefest (*Wesener*, *Babes*, *Baumgarten*, *Lubimoff*), der *Smegmabacillus* wieder ist kaum alkoholecht (*Honsell*, *A. Fränkel*, *Alvarez-Tavel*) auch schwächer säurefest (*Klemperer*) und wird ihm meist die Säurefestigkeit durch Fettextraktion leicht entzogen (*Bunge-Trautenroth*, *Weichselbaum*, *Brereton-Smith*). *Fontes* differenziert Tuberkel- und Pseudotuberkelbacillen, indem er nach *Ziehl*-Färbung mit Essigsäure-Alkohol entfärbt und eine Gram-Färbung folgen läßt. Nur die ersteren sollen dabei einen roten Leib aufweisen. Angesichts der etwas wechselnden Eigenschaften der Säurefesten sind freilich diese färberischen Differentialdiagnosen nicht ganz zuverlässig. Auf die Variabilität der Säurefestigkeit der Aktinomycceten hat insbesondere *Claypole* hingewiesen. Merkwürdig ist die schon erwähnte von *Yamamoto* vorgeschlagene Differenzierungsmethode zwischen Lepra- und Tuberkelbacillen. Bei Versilberung mit erwärmter Silbernitratlösung und nachträglicher Reduktion mit Pyrogallol und Tannin sollen Tuberkelbacillen sich schwärzen (sind „silberpositiv“), Leprabacillen ungefärbt bleiben. Eine Erklärung für dieses Verhalten steht noch aus. Auch auf Grund der Alkalifestigkeit nach *Gasis* hat man eine Differenzierung verschiedener Säurefesten durchzuführen versucht (*Ehrlichówna*). Nach *Bozzelli* widerstehen mit Methylenblau gefärbte Tuberkelbacillen der Neutralrotentfärbung, Paratuberkelbacillen dagegen nicht.

Eine besondere Besprechung erfordert die färberische Differenzierung und der Nachweis der sog. Granula der Säurefesten. Schon frühzeitig beobachtet (*Koch*, *Ehrlich*, *van Niessen*, *Metschnikoff*, *Lutz*, *Unna*, *Hermann*, *Schrön*, *d'Arrigo*, *Coppen Jones*, *Spengler*,

Sander, Wladimiroff, Preisz, Günther, Maffucci, Mircoli u. a.), wurden dieselben vielfach bis in die neueste Zeit hinein als Sporen angesprochen. Freilich ohne Beibringung der erforderlichen biologischen Beweise. In neuerer Zeit haben dieselben (oder wie behauptet wird ein Teil von ihnen) größere Bedeutung erlangt durch die Befunde von *Much*, der durch besondere Methoden aus dem Stäbchenverband isolierte Granula, auch kleinste bis zur Stäubchengröße, färberisch darstellen konnte. Dieselben sollen nach ihm eine besondere Entwicklungsform des Tuberkelbacillus darstellen und befähigt sein, die Stäbchenform, aus der sie stammen, wieder aus sich hervorgehen zu lassen, sollen also auch infektionstüchtig sein. Nach der diagnostischen Seite hin sieht *Much* die Hauptbedeutung der nur gramfärbbaren Granula darin, daß sie auch in Fällen vorkommen sollen, in denen ziehlfärbbares Virus vermißt wird. Es kann hier auf die Frage der Sonderexistenz des *Muchschen* „granulären Virus“ sowie die daran sich knüpfenden biologischen Probleme nicht eingegangen werden. Referent glaubt, daß bindende Beweise für die *Muchschen* Behauptungen bisher noch nicht vorliegen, uns interessiert hier nur das färberische Problem der Granuladargestellung!

In dieser Hinsicht ist vor allem festzustellen, daß die Granula fast in allen Säurefesten in allen Entwicklungsstadien in mehr oder minder großer Anzahl auch bei den gewöhnlichen Färbemethoden mitgefärbt werden. Wenn sie oft nicht hervortreten, so liegt das an einer Überfärbung der Stäbchen besonders in jüngeren Stadien (nicht in allerjüngsten), wo sie sehr farbecht sind (*Heydenreich, Eisenberg*). Mit dem Altern der Stäbchen und mit dem Einsetzen von Degenerationsvorgängen sinkt die Farbstoffaffinität bzw. Säurefestigkeit des Stäbchens und die Granula, die eine höhere Farbfestigkeit aufweisen, treten dann besser hervor, auch bei der *Ziehl*-Färbung, wie besonders hervorgehoben werden mag. Hierher gehören auch die Granula, die *Markl, Kraus* und *Hofer, Arima* u. *Sawamura, Rist, Léon-Kindberg* u. *Rolland* bei der Reinjektion von Tuberkelbacillen in die Bauchhöhle vorbehandelter Meerschweinchen auftreten sahen. *Burnet* bestreitet jedoch, daß es sich dabei um Degenerationsprodukte der Bacillen handle, sondern nimmt die Präexistenz der Granula in der injizierten Kultur an. Auch *Lucciarini* beschreibt bei subcutaner Injektion von erhitzten Tuberkelbacillen bei Meerschweinchen das Auftreten von zuerst gram- und säurefesten, dann nur noch gramfesten Granulis, die allmählich auch noch die Gram-Färbbarkeit einbüßen. Färberisch zeichnen sich die Granula eben durch ihre erhöhte Farbstoffaffinität und Farbechtheit sowie durch eine Vorliebe für dunkle Farbstoffe, relative Cyanophilie (*Eisenberg, Krylow*) aus, zwei Eigenschaften, die sie am besten, wenigstens zum Teil als sog. metachromatische (*Ernst-Babessche*) oder Volutingranula auffassen lassen. Das ist auch wohl die Ursache, weshalb sie am besten mit der Gram-Methode oder analogen Methoden dargestellt werden, doch

können sie, wie *Eisenberg* zeigen konnte, auch mit einer Reihe anderer dunkler Farbstoffe (*Manson*-Blau nach *Ziehl*-Färbung, *Viktoriablau*, *Nachtblau*, *Amethystviolett*, *Fuchsia*, *Neutralviolett*, *Echtneutralviolett*, *Brillantgrün*, *Capriblau*, *Brillantkresylblau*, *Indazin*, *Bindscheiders Grün*, *Thionin*, *Toluidinblau*, *Gentianin*, *Äthylenblau*, *Azur I*) bei entsprechender Beizung und Differenzierung dargestellt werden. Ihre Affinität für dunkle Farbstoffe offenbart sich auch bei Doppelfärbungen, wobei sie mit dunklen Farbstoffen gefärbt werden, während der Rest des Stäbchens den helleren Farbstoff aufnimmt (*Babes*, *Czaplewski*, in neuerer Zeit *Hatano*, *Weiß*, *Aronson*, *Rosenblatt*, *Fontes*, *Wehrli* und *Knoll*, *Eisenberg*, *Spehl*). Besonders beweisend sind natürlich jene Methoden, bei denen die Doppelfärbung einzeitig aus einem Farbgemisch erfolgt.

Es erscheint jedoch nicht berechtigt, wenn *Much* und nach ihm *Krylow*, *Marmann* u. a. die Granula und den restlichen Stäbchenleib als „gramfärbbare“ und „ziehlfärbbare Substanz“ gegenüberstellen. Wie wir gesehen haben, sind beide sowohl gram- als auch ziehlfärbbar, nur in verschiedenem Grade und, solange wir die Ursache der vorhandenen Differenzen nicht kennen, führt uns die Schaffung neuer „Substanzen“, an denen die Biologie ohnehin schon ein Übermaß besitzt, keinen Schritt vorwärts und verleitet zur Auffassung von zwei wesensverschiedenen chemischen Substraten, die gar nicht berechtigt ist. Und selbst wenn es gewisse Zustände der Granula gibt, wo sie nur mehr nach *Gram* (u. zw. mit einer verstärkten Färbung), nicht mehr aber nach *Ziehl* färbbar sind (wohl unter dem Einfluß von Schädigungen seitens des infizierten Organismus), so beweist das eben nur, daß die *Gram*-Festigkeit der Granula Schädigungen länger standhält als ihre Säurefestigkeit. Einen analogen Fall kennen wir bereits durch die Versuche von *Gabritschewsky* und *Eisenberg*. Bei Schädigung des Tuberkelbacillus durch Trockenhitze erweist sich ebenfalls die *Gram*-Festigkeit als etwas resistenter von der Säurefestigkeit. Ebenso fanden *Rochaix* u. *Colin*, daß durch Quarzlampebeleuchtung Tuberkelbacillen ihre Säurefestigkeit einbüßen können ohne Schädigung ihrer *Gram*-Färbbarkeit. So kommt es, daß die Granula, der gramfesteste Teil des Bacillus, auch bei biologischen Schädigungen im Organismus zuerst ihre Säurefestigkeit einbüßen könnten und dann sich nur mit einer (verstärkten!) *Gram*-Färbung nachweisen ließen. Es liegt demnach kein Anlaß vor, von einer „gramfärbbaren“ Substanz zu sprechen; wir haben hier ein ziehl- und gramfärbbares Substrat vor uns, in lädiertem Zustand, wo es nur mehr (schwach) gramfest ist.

Zu der Analogisierung der Granula mit den sog. metachromatischen bei anderen Bakterien stimmt gut der Befund von *Wherry*, daß dieselben mit Nilblausulfat und Neumethylenblau sich metachromatisch färben. Ebenso paßt dazu die von *Eisenberg*, *Minder* sowie *Wherry* beobachtete Hyperchromasie dieser Granula, d. h. ihre Neigung zur Über-

färbung, die es bedingt, daß die bereits mit Carbofuchsin imprägnierten Gebilde noch nachträglich Methylenblau aufnehmen, was der Rest des Stäbchens nicht tut. Die besonderen Eigentümlichkeiten ihrer Färbbarkeit (die sich oft als launisch erweist) sind wahrscheinlich auf chemische Bestandteile zurückzuführen, die sie mit dem ganzen Stäbchen gemeinsam haben. Vielleicht ist darauf die besondere Eignung gewisser Beizen zu ihrer Darstellung zu beziehen, so des Jods (*Lutz, Unna, Much, Kronberger, Eisenberg, Porges, Reichert, Carpintero, Mayoral* u. *Gamero*), des Broms (*Eisenberg*), der Salpetersäure (*Voltolini, Much, Eisenberg*). Mit der Analogisierung der Granula mit den Volutinkörnchen würde ferner die Ansicht gut übereinstimmen, daß dieselben aus Eiweiß bestehen sollen (*Much, Deycke, Weiß, Wirths*, während *Aronson* sowie *Krylow* und *Miller* sie als fettartig betrachten). Möglicherweise entspricht nur ein Teil der nach *Much* färbbaren Granula den Volutinkörnchen, es färben sich nämlich nach der *Neisser*-schen Körnchenmethode oder mit *Giemsa*-Blau nur zwei endständige Granula (*Coppen Jones, Minder*). Nach *Wherry* begünstigen bestimmte Nährstoffe die Bildung der Granula (z. B. die niederen aliphatischen Alkohole und verschiedene Kohlehydrate). Scharlachrot soll nach diesem Autor die Granula ungefärbt lassen (was gegen ihre Fettnatur spricht), dagegen färben basische besonders dunkle Farbstoffe die Granula bei Feuchtfärbung leicht an (Neumethylenblau N Cass. färbt dabei metachromatisch), was ebenfalls die Analogie mit den Volutin-granula bekräftigt. Nach *Fitschen*, die sich dabei auf *Grimme* beruft, wären die Granula überhaupt keine präexistierenden Gebilde, sondern sollen ihre Entstehung zum Teil physikalischen Faktoren verdanken (Quellung?).

Im Anschluß an die *Much*sche Hypothese wäre vielleicht noch die Vorstellung zu erwähnen, die *Bergel* von der anatomischen und mikrochemischen Struktur der Tuberkelbacillen sich gebildet hat. Nach dieser Auffassung hätten wir von außen beginnend zuerst einen säure- und alkoholfesten Wachsmantel, darunter ein säure- und alkoholschwächeres Fettsäurelipoidgemisch, darin eingelagert Granula verschiedener Größe mit einer äußeren säurefesten und inneren nicht säurefesten Neutralfettschicht (die nach *Gram* bzw. *Much* färbbar ist) und endlich einen inneren aus Eiweiß bestehenden Stäbchenkern, säure- und alkoholschwach, auch nach *Gram* nicht färbbar mit eingelagerten ebensolchen Körnchen, die die innerste Schicht der oben erwähnten Granula bilden.

Die Frage nach der Ursache der Säurefestigkeit (die wohl mit jener nach der Ursache der Alkohol-, Alkali- und Formolfestigkeit zusammenfällt) ist wie das Problem der *Gram*-Festigkeit trotz eifriger Bearbeitung bis jetzt noch nicht endgültig gelöst. Auch hier haben wir neben physikalischen Theorien chemische und gemischte zu verzeichnen. Die älteste ist die „Hüllentheorie“ von *Ehrlich*, nach der eine die Bacillen umgebende Fetthülle die Färbung erschweren

und durch die Beize erst permeabel gemacht werden sollte, dieselbe sollte auch den entfärbenden Säuren den Eintritt in das gefärbte Stäbchen verwehren. Diese Theorie wurde unhaltbar, als *Ziehl* durch direkte Beobachtung nachwies, daß unter Säurewirkung das fuchsin-gefärbte Stäbchen rotbraun wird, also die Farbe des dreisäurigen Rosanilinsalzes annimmt, daß folglich die Säure tatsächlich eindringt. Daraufhin modifizierte *Ehrlich* die Hüllentheorie, indem er annahm, daß die Hülle die Säure zwar hineinpasse, aber unter Säurewirkung für das große Farbstoffmolekül undurchgängig wird und ihn deshalb nicht heraustreten läßt. Für andere Entfärber als Säuren (Wasser, Farbstoffe, Formaldehyd, Alkalien) würde sich diese Annahme kaum adaptieren lassen. Gegen *Ehrlich* hat *Gottstein* hervorgehoben, daß Lanolin, Cholesterin sowie Fettsäurekrystalle ebenso wie Tuberkelbacillen säurefest sind, obwohl doch bei ihnen an eine Hülle nicht zu denken ist (säurefest ist aber die Cuticula der Pflanzen nach *A. Fischer!*).

Der in gewissem Sinne chemischen Theorie von *Ehrlich* sowie der ebenfalls chemischen später noch zu erwähnenden von *Koch* stellt *A. Fischer* eine rein physikalische entgegen (ihm schließt sich darin *Pappenheim* an). Die Säurefestigkeit zeigt nach ihm den höchsten Grad von Dichtigkeit der Struktur an (höher als die von der *Gram*-Festigkeit angezeigte), die eine sehr energische, selbst durch Säure schwer überwindbare Adsorption des Farbstoffs gewährleistet. Die von *Koch* beobachtete Vernichtung der Säurefestigkeit durch heiße Kalilauge führt *Fischer* auf Quellung der Bakteriensubstanz und dadurch herabgesetzte Adsorptionsfähigkeit zurück. *Unna* verteidigt demgegenüber auch hier die chemische Theorie, indem er die Annahme einer schützenden Hülle für entbehrlich hält und eine starke (Doppelsalz-) Bindung des Farbstoffs an die Bacillensubstanz postuliert, die von der Säure nicht gesprengt werden kann.

Auf die Eruierung des Substrats der Säurefestigkeit in der Bacillensubstanz gingen weitere Untersuchungen aus, welche einerseits die Bacillen der Säurefestigkeit zu berauben suchten, andererseits in chemischen Untersuchungen der Säurefesten dieses Substrat zu finden hofften. Daß ein derartiges „säurefestes“ Substrat im Leib der Säurefesten enthalten sein dürfte, scheint aus Beobachtungen hervorzugehen, daß die Art des Nährbodens den Grad der Säurefestigkeit beeinflussen kann. Nach *Dostal* sind auf saponinhaltigen Nährböden gezüchtete Tuberkelbacillen säure- und alkoholschwach, ebenso nach *Frei* und *Pokschischewsky* verschiedene Säurefeste bei Züchtung auf Kartoffeln, saurem Glycerin, Agar oder in Milch. Bei *Smegmabacillen* ließ sich nun zunächst eine Abhängigkeit der Säurefestigkeit vom Fettgehalt des Mediums dadurch nachweisen, daß sie durch fettlösende Agenzien ihrer Säurefestigkeit beraubt werden können. Gegen die ungebührliche Verallgemeinerung, eine Fetthülle sei bei allen Säurefesten die Ursache der Säurefestigkeit, indem sie den Farbstoffeintritt, aber auch die Ent-

färbung erschwere (*Bienstock, Spina*), wandten sich mit Recht *Bitter, Gottstein, Grigorjew, Helbing*, indem sie darauf hinwiesen, daß bei Tuberkelbacillen die Säurefestigkeit nicht so leicht zu beheben ist, daß sie hier also in der Stäbchensubstanz selbst ihre Ursache haben muß. *Hammerschlag* folgert aus der Tatsache, daß die Säurefestigkeit durch Kalilaugenextraktion vernichtet wird, sowie, daß die isolierten Eiweißkörper des Tuberkelbacillus an sich nicht säurefest sind, daß eine besondere Kombination von Eiweiß- und Celluloseeteilchen in der Stäbchensubstanz die Säurefestigkeit bedingt. *Klebs* extrahierte aus Tuberkelbacillen einen fettartigen Körper, der säurefest war und den er für die färberische Eigenart verantwortlich machte. *Koch* sah das Substrat der Säurefestigkeit in einer in Alkohol unlöslichen Fettsäure, die in Form einer Schutzhülle das Stäbchen umgibt und in vitro sich als säurefest erweist. *Aronson, Ruppel, Kresling, Bulloch u. Macleod, Dorset u. Emery, Tamura, Bürger* identifizierten diesen Körper als Wachs, aus dem sich ein mit Cholesterin nicht identischer höherer Fettalkohol isolieren ließ, der stark säurefest war und demnach als die eigentliche säurefeste Substanz der Tuberkelbacillen angesprochen wurde. Das Wachs soll in den Kulturen zum Teil ein extracelluläres Sekretionsprodukt bilden (*Aronson*). Die aus dem Wachs abgeschiedenen Fettsäuren sollen nicht säurefest sein. Dementgegen glaubt *Deycke*, daß gerade freie Fettsäuren Träger der Säurefestigkeit sind (ebenso *Camus u. Pagniez*), während ein Neutralfett, daß er aus Tuberkelbacillen extrahieren konnte („Tuberkulonastin“), sich mit *Ziehl* überhaupt nicht färben läßt und die Ursache der Färbungsresistenz der Bacillen abgeben soll. Nach neueren Untersuchungen von *Bürger* entspricht das Tuberkelbacillenfett dem Pflanzenwachs und enthält neben geringen Mengen von Neutralfett ungesättigte Fettsäuren. Laurin- und Palmitinsäure, sodann Alkohole ($C_{15}H_{27}OH$, $C_{19}H_{35}OH$, $C_{21}H_{43}OH$), jedoch kein Cholesterin.

Ist nach diesen Befunden mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß ein Wachskörper sowie Fettsäuren an der Säurefestigkeit der Tuberkelbacillen (diese wurden bisher meist untersucht) beteiligt sind, so war weiter noch die Forderung zu erfüllen, daß die durch entsprechende Extraktionsmittel der fettartigen Stoffe beraubten Bacillen ihre Säurefestigkeit einbüßen sollten. Darüber gehen nun die Erfahrungen verschiedener Forscher weit auseinander. *Klebs, Borrel, Ritchie, Camus u. Pagniez, Cantacuzène, Geipel* (mit Anilin), *Krylow* wollen mit reinen Fettlösungsmitteln Tuberkelbacillen der Säurefestigkeit beraubt haben, ebenso *Grimme* den *Timotheebacillus* und den *Geflügelbacillus*. Andere wie *Fontes, Aronson, Helbing, Auclair u. Paris* und *Kozniewski* haben nach gründlicher Extraktion die Bacillen zwar dünner, aber immer noch säurefest gefunden. Nach *Sabrazès* läßt Extraktion mit Äther, Xylol Chloroform die Säurefestigkeit der Tuberkelbacillen intakt, ebenso Pikrinsäure, Phenol, Sublimat; durch starke Mineral-

säuren, Chromsäure, Osmiumsäure und Formol soll dieselbe leiden. Da *Aronson* eine unvollständige Extraktion annahm, hat er dann als Extraktionsmittel Salzsäurealkohol, später Trichloräthylen, *Deycke* und *Much* zu demselben Zweck Benzoylchlorid verwendet. Dagegen wendet *Kozniewski* wohl mit Recht ein, daß hierbei die Einwirkung der zugesetzten bzw. abgespaltenen Salzsäure auf andere Bestandteile des Bacillus den eintretenden Verlust der Säurefestigkeit herbeiführen kann. Gegen die Fetttheorie spricht ferner die Tatsache, daß die von *Dorset* angegebene Färbung der Tuberkelbacillen mit dem Fettfarbstoff Sudan III von den Nachuntersuchern nicht bestätigt werden konnte (s. auch *Corper*, *Sata*, *Ritchie*).

Auf der Fetttheorie basieren dagegen die Annahmen von *Bergel*, *Metelnikov*, *N. Fiessinger* u. *Marie*, *Burtel* u. *Neumann*, daß an der Abwehr des tierischen Organismus gegen den Tuberkelbacillus in erster Reihe (den lymphatischen Organen bzw. Lymphocyten entstammende) lipolytische Fermente beteiligt sind, die durch Auflösung der Wachshülle einen Verlust der Säurefestigkeit herbeiführen können. Auf diese Weise entfettete Bacillen sollen weiter durch proteolytische Fermente aufgelöst werden. *Fontes* nennt das lipolytische Ferment der tuberkulösen Lymphdrüsen Tuberculocirase*. Zur Fetttheorie bekennen sich auch *Deycke* und *Much*, die unter den tuberkulösen Partialantigenen Lipotide, Fettsäuren und Neutralfette aufführen. Für diese Theorie ließe sich endlich die (in verschiedenem Grade ausgeprägte) Säurefestigkeit der Fetteinschlüsse der Bakterien anführen (*A. Mayer*, *Eisenberg*, *Wälsch*). Im Sinne der Fetttheorie will *Dostal* die mangelhafte Säurefestigkeit der auf saponinhaltigen Nährböden gezüchteten Tuberkelbacillen darauf zurückführen, daß Saponin die die Säurefestigkeit bedingende Wachssubstanz durch Emulgierung weglösen soll.

Andere Autoren suchen in anderen Bestandteilen des Tuberkelbacillus das Substrat der Säurefestigkeit. Von der Beobachtung ausgehend, daß die chitinhaltigen Bandwurmeier ebenso andere chitinhaltige Objekte (s. oben) säurefest sind, will *Helbing* in dem Chitin, das *Ruppel* in den Tuberkelbacillen vermutet hatte, die Ursache ihrer färbereichen Eigenart gefunden haben. *Czaplewski* bestätigt diese Ansicht durch Hinweis auf die Säurefestigkeit des Chitinpanzers der Insekten, des Lycopodiumsamens, der Hornschicht der Epidermis, der Haare (*Cornil* u. *Babes*). Spätere Forschungen haben die Existenz des Chitins bei Bakterien nicht bestätigen können (*Wisselingh*). *Kozniewski* hat aus Tuberkelbacillen eine Hemicellulose extrahieren können, die durch Säurehydrolyse weiter gespalten wird und einen Zucker abspaltet. In diesem Körper sieht *Kozniewski* das Substrat der Säurefestigkeit: seine Zersetzung durch Einwirkung erhitzter verdünnter

* *Beumer* bezweifelt neuerdings die lösende Wirkung der Serumlipase auf Tuberkelbacillen (D. med. Woch. 1921, Nr. 13, S. 370).

Mineralsäuren soll den dabei erfolgenden Verlust der Säurefestigkeit erklären. Es ist freilich dazu zu bemerken, daß auch die Eiweißstoffe und Lipide der Tuberkelbacillen bei dieser Behandlung chemische und physikalische Umwandlungen erfahren dürften. Diese Hemicellulose soll nach *Kozniewski* wahrscheinlich die Hülle des Tuberkelbacillus bilden.

Eine eklektische Theorie haben auf Grund eingehender Untersuchungen *Auclair* u. *Paris* aufgestellt. Da Fettextraktion nicht genügt, um den Bacillen die Säurefestigkeit zu entziehen, glauben sie, daß von chemischer Seite sowohl die fettwachsartigen Substanzen, wie Eiweißkörper und Cellulose, von physikalischer aber eine besondere Dichtigkeit der Struktur für dieselbe verantwortlich zu machen sind. Auch nach *Pappenheim* soll sowohl ein sehr dichtes Gefüge der Leibessubstanz als auch der Fett- bzw. Wachsgehalt die Säurefestigkeit bedingen. Hierher ist wohl auch die Auffassung zu rechnen, die *Benians* durch interessante Versuche begründet. Er fand, daß gefärbte Tuberkelbacillen durch Zerreiben ihre Säure- und *Gram*-Festigkeit einbüßen, ebenso, wenn sie zuerst zerrieben und dann der Detritus gefärbt wird (er ist dann auch im Gegensatz zu intakten Bacillen leicht färbbar, früher auch von *Koch* und von *Krylow* festgestellt). *Benians* folgert daraus, daß die färberische Eigenart der Bacillen ihre strukturelle Intaktheit zur Voraussetzung hat (ebenso äußert sich *Sherman*); als ihre wahrscheinliche Ursache nimmt er eine Wachshülle an, die die schwere Permeabilität bedingt und einen aus Eiweiß und fettartiger Substanz bestehenden Bacillenleib.

Wie wir aus diesen Erwägungen ersehen, ist das Problem der Säurefestigkeit bis jetzt noch nicht endgültig gelöst; soviel scheint aus dem vorliegenden Material hervorzugehen, daß nicht ein einzelner Bestandteil der Bacillen ausschließlich ihr färberisches Verhalten zu erklären imstande ist, sondern daß im Sinne der eklektischen Theorien wahrscheinlich verschiedene Bestandteile und dazu noch physikalisch-strukturelle Eigentümlichkeiten dabei berücksichtigt werden müssen. Damit würden die Beobachtungen stimmen, daß durch Erhitzen die Bacillen ihre Säurefestigkeit, zugleich aber auch ihre Färbungsresistenz für gewöhnliche Farblösungen einbüßen (*Gabritschewsky*, *Eisenberg*), ebenso durch oxydierende Agenzien, erhitztes Pyridin, erhitzte Jodtinktur (*Eisenberg*) sowie durch Einwirkung ultravioletter Strahlen (*Cernovodeanu* u. *Henri*).

Die Alkalifestigkeit weist nach *Dold* weitgehende Analogien mit der Säurefestigkeit auf, insbesondere bezüglich der Resistenz gegenüber verschiedenen Eingriffen; sie widersteht 15—24stündiger Behandlung mit 10%iger Salzsäure, 20%igem Antiformin, Äther, 30tägiger mit dreifach normaler Natronlauge; Behandlung mit heißer Lauge vernichtet sie. Daher nimmt *Dold* für beide färberische Eigenschaften ein gemeinsames Substrat in den Säurefesten an.

Mit der „Säurefestigkeit“ sensu stricto dürften wahrscheinlich einige andere färberische Eigentümlichkeiten der Säurefesten zusammenhängen bzw. identisch sein, so die „Formolfestigkeit“ ihrer Färbung, ihre „Kochfestigkeit“, ihre Resistenz gegen oxydative Entfärbung, ihre „Saponinfestigkeit“ (*Eisenberg*), sodann die Beobachtung von *Unna* und *Eisenberg*, daß mit Boraxmethylenblau gefärbte und dann jodierte Lepra- und Tuberkelbacillen bei Differenzierung mit Alkohol und Kreosot wohl das Methylenblau, nicht aber das Jod abgeben, während andere Bakterien und sonstige Gewebssubstrate Jod und Methylenblau abgeben (also „Jodaffinität“ der Tuberkelbacillen). Hierher gehört wahrscheinlich auch die Eigenschaft der Leprabacillen (*Unna*) sowie Tuberkelbacillen (*Eisenberg*), mit Safranin sich metachromatisch goldgelb zu färben.

3. Die differentielle **Strahlenpilzfärbung** beruht auf der Tatsache, daß die Fäden selbst basische Farbstoffe gut aufnehmen, während die Kolben (umgewandelte Membran?) gramnegativ sich verhalten und am besten mit hellen Säurefarbstoffen (Eosin, Orseille, Orcein, Pikrocarmin, Säurefuchsin, Pikrinsäure) sich färben. Kommt es nur auf Darstellung des Fadengeflechtes an, so färbt man nach *Gram*, sollen die Kolben hervortreten, so färbt man mit angesäuerter Orceinlösung (*Israel*). Meist wird eine Doppelfärbung angestrebt; man erhält sie durch *Gram*-Färbung mit nachfolgender Kontrastfärbung mit einem der Säurefarbstoffe (z. B. Orcein nach *Ciechanowski*). *Boström* färbt mit Anilinwassergentiana, dann mit Pikrocarmin (wirkt als Kontrastfarbe und als Beize, wie in *Eisenbergs* Ersatzmethoden für *Gram* die Säurefarbstoffe nach den basischen), differenziert mit Alkohol. *Weigert* färbt umgekehrt mit Orseille vor, dann mit Gentiana und differenziert mit Alkohol; auch diese Methode kann, wie die vorhergehende als *Gram*-Modifikation betrachtet werden: das Orseille wirkt hier als Beize für Gentiana, zugleich als Kontrastfarbe für die Kolben. *Sata* endlich benutzt den Fettgehalt der Kolben, um sie mit Sudan III rosa zu färben, nachdem die Fäden mit Hämatoxylin vorgefärbt wurden. *Schlegel* färbt ebenfalls das Fadengerüst mit Hämatoxylin, die Kolben mit Eosin. Die Fäden selbst sind zum Teil säurefest. Nach *Semenowicz* u. *Marzinowsky* färbt sich das Fadengerüst blau, die Kolben rot (erythrophil) bei sukzessiver *Ziehl-Löffler*-Färbung.

4. **Färbung der Spirochäten.** Dieselben gehören im allgemeinen zu den schwer färbbaren Objekten der Bakteriologie, besonders aber die feineren Formen wie die *Spirochaeta pallida*, *Spirochaeta pertenuis*, *Spirochaeta microdentium*, *Spirochaeta ictero-haemorrhagiae* (*Spirochaeta icterogenes* s. *nodosa*), *Spirochaeta gallinarum* u. a.

In dieser Hinsicht nähern sich dieselben den Bakteriengeißeln, worauf wohl zurückzuführen ist, daß manche Geißelfärbungsmethoden mit Erfolg auf Spirochäten übertragen werden konnten. Das gilt im Prinzip vor allem von den verschiedenen Silberimprägnationsmethoden,

die auf Reduktion löslicher Silbersalze beruhen (*Stern, Bertarelli-Volpino, Levaditi-Manouélian, Versé, Dohi, Barannikoff, Revaut, Fontana, Tribondeau, Hollande, Gyenes-Sternberg* nach *Liesegang*). Ebenso wie die Geißeln scheinen sie sauren Farbstoffen zugänglich zu sein (*Gottberg, Eisenhämatoxylin*). Basische Farbstoffe, besonders dunkle, wurden vielfach mit verschiedenen Beizen (*Phenol, Anilin, Tannin, Lithiumcarbonat, Kaliumcarbonat* nach *Gradle, Kalilauge* nach *Shmamine, Phosphorwolframsäure* nach *Reitmann, Natriumarsenit* nach *Löffler, Formol* nach *Spehl, Tannin* nach *Renaux* u. *Wilmaers, Eisentannatfuchsin, Kaliumpermanganat* nach *Hoffmann* u. *Halle*) angewandt. Durch längere Einwirkungsdauer (Nilblau- oder Capriblaufärbung durch 16—24 Stunden nach *Herxheimer* u. *Huber, Kresylviolett R extra* ges. bis 10 Stunden nach *Davidson*) oder Erwärmen der Lösungen wurde versucht, die Farbwirkung zu steigern (*Schereschewsky* mit *Giemsa*). Als besonders geeignet zu strukturellen Studien fand man, wie sonst bei Bakterien, verschiedene Abarten der *Romanowsky-Färbung* (nach *Giemsa, Marino, Leishman, Jenner, May-Grünwald, Carageorgiadès, Gauducheu, Grosso, Hollande, Jonesco-Mihaesti, Lesieur* u. *Acquet, Tribondeau, Tribondeau, Fichet* u. *Dubreuil, Stérenel* u. a.). Über die Feststellung im Negativbild sowie bei sog. vitaler Färbung vgl. die entsprechenden Abschnitte.*

C. Über die Differenzierung der Bestandteile der Bakterienzelle.

1. Sporenfärbung. Sporen sind derjenige Bestandteil der Bakterienzelle, der nicht nur morphologisch und färberisch, sondern auch biologisch sich am schärfsten vom vegetativen Zelleib differenziert. Auch ist es am naheliegendsten anzunehmen, daß es ein und dieselbe Eigentümlichkeit der Struktur ist, die sowohl ihre biologische Eigenart, die erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Schädlichkeiten, als auch die färberische, die Färbungsresistenz und die Farbfestigkeit bedingt. Diese Strukturbeschaffenheit wurde öfters in der schweren Durchlässigkeit der Sporenmembran vermutet (*Ernst*), für die biologische Resistenz läßt sich diese Annahme nicht auf ihre Stiehältigkeit prüfen, färberisch erscheint sie nicht gerade plausibel, da die Sporenmembran selbst (wenigstens die sog. Exine) leicht färbbar, ja sogar hyperchromatisch ist, wie sich bei Färbung mit sehr schwachen Farblösungen feststellen läßt. Besser begründet erscheint die Annahme, daß es die gedrungene Kompaktheit der Sporensubstanz selbst ist, die

* Eine Elektivfärbung für Influenzabacillen hat neuerdings *de Seiras-Palma* (Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1919, Orig. LXXXIII, S. 507—509) angegeben (Imprägnierung mit HgCl_2 , Reduktion mit Thiosulfat ergibt schwarzen Kern, Rest nachgefärbt mit verdünntem Carbofuchsin). Die Elektivität erscheint etwas auffallend. Die Arbeit von *Bezsonoff N.* (Arb. a. d. Inst. f. exper. Ther. zu Frankfurt a. M., G. Fischer, Jena 1920, H. 8) „Versuche über färberische Differenzierung von Bakterien“ habe ich leider infolge der gegenwärtigen Notlage nicht lesen können.

in der biologischen Resistenz und den Färbungseigentümlichkeiten zum Ausdruck gelangt, eine Annahme, zu der sich auch *A. Fischer* bekennt. Auffallend ist jedenfalls die bereits von *Buchner* festgestellte Tatsache, daß alle Maßnahmen, die die Färbungsresistenz der Sporen überwinden, auch zu ihrer Abtötung geeignet sind.

Die Eigenschaften, die wir bei den Säurefesten kennen gelernt haben, finden wir in etwas schwächerem Grade meist bei den Sporen wieder (*Ernst*). Auch sie sind gram- und bis zu einem gewissen Grad auch alkohol- und säurefest. Der Grad der Färbungsresistenz sowie der Säurefestigkeit wechselt von Art zu Art, auch bei ein und derselben Art sind Sporen von verschiedenem Reifungszustand darin verschieden, dieselben nehmen, wie die biologische Resistenz, eine Zeitlang zu, um beim Altern der Sporen wieder abzunehmen. Die Färbungsresistenz der Sporen wird überwunden durch verschiedene sog. Macerationsprozeduren, d. h. kolloidchemisch gesprochen durch dispersionserhöhende Agenzien. Als solche fanden Verwendung: konzentrierte Schwefelsäure (*Buchner*), Chromsäure oder Chlorzinkjod (*Möller*), heiße Salzsäure (*Aujeszký*), Natriumsalicylat (*Orszag*), heiße Platinchloridlösung (*Thiesing*), Wasserstoffsuperoxyd (*Toth*), Formaldehyd (*Bitter*), heiße Lugol-Lösung (*Tribondeau*). Zur Überwindung der Färbungsresistenz dienen ferner: Erhitzen der Farblösung (*Klein, Heim*), ihre Verstärkung durch Beizen (Phenol, Ammoniak, *Fiocca*, Natronlauge *Waldmann, Kent*, Jod *Hanzawa*, Anilin, Thymen, Borax u. a., Säuren bei sauren Farbstoffen *Eisenberg, Botelho*), Erhitzen des Sporenmaterials vor der Färbung (*Buchner, Hüppe, Eisenberg*). Wirken diese Agenzien länger ein, so werden die Sporen auch gewöhnlichen Färbungsprozeduren zugänglich, doch ist dann die Färbung nicht mehr so echt.

Was die zur Sporenfärbung verwendbaren Farbstoffe betrifft, so sind es sowohl basische als auch manche saure Farbstoffe; auffallend ist, daß hellere Farbstoffe sich meist besser eignen, was für einen Zusammenhang von Xantho- bzw. Erythrophilie mit der Dichtigkeit des Substrats zu sprechen scheint (*Eisenberg*). Durch Kombination zweier entsprechender Farbstoffe (z. B. von Chinagrün mit Fuchsin, Pyronin oder Safranin, von Ponceau, Bordeaux, Azorubin, Viktoriascharlach, Brillanteroceïn mit Chinablau) hat *Eisenberg* einzeitige Doppelfärbungen von Sporen und restlichem Stäbchenleib erzielt; ebenso neuerdings *Botelho* (Lichtgrün und Fuchsin S). Als Erythrophilie ist wahrscheinlich auch die Tatsache zu deuten, daß es nach *Huntoons* Methode gelingt, Sporen aus einem Gemisch von Säurefuchsin und Methylenblau rot zu färben.

Zur Differenzierung der gefärbten Sporen vom restlichen Bacillenleib, bzw. Erzielung von Doppelfärbungen bedient man sich entweder saurer Entfärber, wobei die Variabilität der Säurefestigkeit die Handhabung recht subtil und nicht immer zuverlässig gestaltet (*Buchner, Hauser, Möller, Fiocca, Aujeszký, Klein, Orszag, Marx*), oder es wird

mit Alkohol (*Thesing*), oxydativen Entfärbern (*Müller, Trincas, Eisenberg*), Formalin (*Trincas, Eisenberg*), Saponin (*Eisenberg*) entfärbt, oder endlich man benutzt zur Differenzierung die Verdrängung durch andere Farbstoffe (*Wirtz, Bitter, Tribondeau*). Junge noch unbehütete Entwicklungsstadien der Sporen (sog. „Vorsporen“) sind wie die Volutingranula hyperchromatisch und unterscheiden sich von den fertigen Sporen durch geringere oder fehlende Säurefestigkeit, die jedoch diejenige des restlichen Zelleibs immer noch übertrifft. Auch hier liegt es nahe, die Hyperchromasie auf größere Dichtigkeit der Substanz zurückzuführen, die jedoch derjenigen der fertigen Sporen nachsteht. Die mit der Sporulation vor sich gehende Herabsetzung der Färbbarkeit des restlichen Zelleibs dürfte am ungezwungensten durch Entzug euchromatischer Substanz seitens der sich bildenden Spore und Rerefaktion des Substrats sich erklären lassen.

2. Geißelfärbung. Die Geißeln sind äußerst feine Gebilde, deren physikalische oder chemische Beschaffenheit eine sehr geringe Farbstoffaffinität bedingt. Färbung mit manchen Säurefarbstoffen erscheint möglich, jedoch meist nicht genügend distinkt. Mit basischen Farbstoffen ist bei manchen leichter färbbaren Geißelarten (*Spirillum undula, Vibrio cholerae, Bacterium typhi*) eine Darstellung durch Färbung mit erhitzten gewöhnlichen Farblösungen ($\frac{1}{2}$ —1 Stunde lang) möglich, bei anderen versagt sie (*Hessert*). Ob die von *Klein* an feuchten Stühlen durch Vermischen mit alkoholischem Anilingentianaviolett dargestellten Geißeln von Choleravibrionen wirklich solche waren oder vielleicht andere Spirillen, muß dahingestellt bleiben, ebenso die Angabe von *Strauss*, der an Choleravibrionen mit Carbofuchsin vital gefärbte Geißeln gesehen haben will. Gewöhnlich muß man, um Geißeln färben zu können, Beizen anwenden, unter denen Tannin in verschiedenen Kombinationen den ersten Platz einnimmt, infolge seiner koagulierenden und verdichtenden Eigenschaften, vielleicht auch, weil es der Geißelsubstanz die fehlende Affinität für basische Farbstoffe verleiht. Wir finden also verschiedene Eisentannatbeizen (*Löffler, Bunge, Welcke, Moore*), reines Tannin (*Peppler, Valenti*), Osmiumtannin (*Plaut, van Ermenghem*), Antimontannin (*Zettnow*), Alauntannin (*Pittfield, Mac Crorie, Tribondeau, Fichet u. Dubreuil*), Eisenalauntannin (*Cerrito*), Eisensulfattannin (*Duckwall, Kral*), Alauntanninsublimat (*Smith*), Alauntannin-Osmiumsäure (*Hugh-Williams*), Carboltannin (*de Rossi*), Orceintannin (*Bowhil*), Jodtannin (*Trenkmann*), Tannin-Phosphorwolframsäure (*Sclavo*), Tannin-Aluminiumchlorid-Zinkchlorid (*Casaes-Gil*), u. zw. allein oder mit Fuchsin, endlich Antimontrichlorid-Formoltannin (*Lancereaux*). Außerdem wird mit Kaliumpermanganat (*Gemelli*), Chromsäure (*Koch, Neuhauss*), Eisenchlorid (*Mc Conkey, Bunge*) gebeizt. Die präparierten Geißeln werden dann meist mit verstärkten Farblösungen gefärbt und auf ihnen ein Farbstoffniederschlag erzeugt; meist sind es basische Farbstoffe, doch sind auch saure ver-

wendet worden (*Koch, Neuhauss*). Beachtenswert ist die Geißelfärbung mit einem anorganischen Farbstoff, dem ammoniakalischen Rutheniumoxychlorid (*Nicolle u. Cantacuzène*). Ein zweites Prinzip verfolgt die Bildung eines metallischen Niederschlages auf den gebeizten Geißeln durch Reduktion von löslichen Silbersalzen, mit denen sie imprägniert werden (*van Ermenghem, Zettnow, Kuntze, Hinterberger, Welcke*). Bei beiden Darstellungsarten ist es selbstverständlich, daß der Bakterienleib infolge des Niederschlages vergrößert erscheint und daß eventuell kapselartige Kunstprodukte um denselben herum mitgefärbt werden, die zu Unrecht von manchen Autoren als Kapseln angesprochen wurden (*Löwit, Kühnemann, Marassini*). Beachtenswert ist die originelle Methode von *Harrison* zur Geißeldarstellung bei *Bacterium radicleicola*. Die im eigenen Schleim eingebetteten Bakterien erscheinen nach einfacher Gentianaviolett-färbung samt ihren Geißeln als farblose Lücken auf dem tiefvioletten Grund des Schleims.

3. Membran, Kapsel, Ektoplasma. Der Geißelsubstanz scheint in ihren färberischen Eigenschaften diejenige der Membran nahezustehen, nur ist sie leichter färbbar. Bei gewöhnlichen Bakterienfärbungen im Trockenpräparat wird die Membran nicht mitgefärbt, erst intensivere färben auch sie mit, wodurch dann der Bakterienleib dicker erscheint. Bei postvitaler (oder vitaler) Färbung feuchter Bakterien tritt sie anfangs gut hervor, verschwindet dann bei Überfärbung. Gewöhnlich liegt die Membran der Rindenschicht des Cytoplasmas (Ektoplasma) dicht an und kann nicht gesondert von diesem zur Anschauung gebracht werden (außer durch Plasmolyse bei gramnegativen Arten). Schrumpft der Protoplast grampositiver Arten beim Altern, so kann man durch Beizung mit Antimontannin oder Tannin allein und nachfolgende Versilberung (*Zettnow, Heim*) oder Färbung mit basischen oder sauren Farbstoffen (*Eisenberg*) die Membran distinkt darstellen. Als Beizen eignen sich auch andere koagulierende Agenzien, wie Sublimat, Goldchlorid, erhitzter Methylalkohol, erhitztes Phenol, p-Chlorphenol, Ameisen- und Essigsäure (*Eisenberg*). Nach *Grimme* ist an alternden Individuen von *Bacillus tumescens* bei der Gram-Färbung die Membran in der Kontrastfarbe darstellbar.

Als Produkt einer schleimartigen Umwandlung und Aufquellung der Außenschicht der Membran ist die an manchen Bakterien im Tierkörper oder in anderen natürlichen und künstlichen Substraten auftretende **K a p s e l** zu betrachten.*

Die chemische Zusammensetzung der Kapselsubstanz scheint nicht bei allen Arten identisch zu sein. Bei manchen, speziell den Froschlaich-

* *Foth H.* (A. f. wiss. Tierheilk. 1910, XXXVI, S. 95 und Zt. f. Inf. u. Hyg. d. Haustiere 1920, XXI, S. 57—65) sowie *Küstenberg H.* (A. f. wiss. Tierheilk. 1917, XLIII, S. 49) bezweifeln die Existenz der Milzbrandbacillenkapsel in vivo; im Dunkelfeldpräparat soll sie nicht auffindbar sein. Sie wäre dann als artifizielles Quellungsprodukt in vitro aufzufassen.

kokken (*Streptococcus*, s. *Leuconostoc mesenteroides* u. verwandte Arten) besteht dieselbe aus Kohlehydraten (Mannan, Dextran) und steht mit dem Kohlehydratstoffwechsel der Mikroben in engem Zusammenhang. Bei anderen (Milzbrandbacillen, Kapselbakterien) hat man Nucleoproteide als Grundsubstanz der Kapsel angenommen (*Hamm, Fürst*), doch besteht zweifellos auch hier ein Zusammenhang mit dem Kohlehydratstoffwechsel, indem Darreichung von Kohlehydraten Kapselbildung begünstigt; das gilt insbesondere auch von den Milzbrandbacillen (*Eisenberg, Ottolenghi, Rottky, Ciani*). Möglicherweise liegen hier Eiweiß und Kohlehydratgemische vor oder vielleicht Glykoproteide*.

Die Kapselsubstanz nimmt basische Farbstoffe unschwer auf, ist jedoch bei grampositiven Arten im Gegensatz zum Cytoplasma gramnegativ. Bei dunklen Farbstoffen kann es leicht zur Überfärbung kommen, indem die überfärbte Kapsel den eingeschlossenen Bakterienleib verdeckt. Um diesem Übelstand zu steuern, differenziert man meist mit Entfärbungsmitteln (wie Alkohol *Faticchi*, Nelkenöl-Methylalkohol *Much*, Essigsäure *Johne, Friedländer, Ribbert*, Alkoholaceton *Nicolle*, Silbernitrat *Kaufmann*, Formalin *Räbiger*, helle Farbstoffe *Eisenberg*), wobei die Kapsel dann durch ihren schwächeren Farbton vom Bakterienleib sich abhebt oder mit einer Kontrastfarbe hervorgehoben wird (*Kaufmann*). Die Kapsel scheint hellere Farbstoffe zu bevorzugen, worauf die Verdrängung von Methylenblau durch Fuchsin bei der *Klettschen* Methode sich zurückführen ließe. Mit Schleim hat die Kapselsubstanz die Metachromasie gemeinsam (*Heim*), auf der ihre Darstellung mittels alkalischer Methylenblaulösungen (*Löffler- oder Manson-Blau* nach *Heim, Eisenberg*) oder der *Giemsa-Lösung* beruht, ebenso ihre Färbung mit Safranin nach *Olt*, mit Dahlia nach *Ribbert*. Die Chrom-Sublimatbeize bei der *Bürgerschen*, die Alauntannin-Sublimatbeize bei der *Muirschen* Methode bezwecken neben der physikalischen Veränderung wahrscheinlich auch eine Herabsetzung der Färbbarkeit der Kapsel, wie sie oben durch Differenzierung erreicht wurde. Eine Schwierigkeit der Kapseldarstellung liegt in der großen Wasserlöslichkeit und Schrumpfungstendenz der Kapselsubstanz. Man sucht ihr zu begegnen durch chemische Fixation (Essigsäure, Osmiumsäure, Sublimat, Silbernitrat *Woloschin*) sowie durch Suspension des Materials in eiweißhaltigen Medien (*Hamm, Huntoou* u. a.). Man muß dabei natürlich bedenken, daß durch Retraktion dieser Medien auch um kapselfreie Bakterien herum farblose Lücken entstehen können, die als

* *Toenniessen E.* (Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1920, Orig. LXXXV, S. 225—237) hat neuerdings festgestellt, daß die Kapseln von *Friedländer-Bakterien* aus einem Polysaccharidgalaktan bestehen; die „tierischen“ Kapseln sollen durch Adsorption von Serumeiweiß an die Gummihülle entstehen. Diese Zusammensetzung soll die Labilität der Kapseln, ihre Fixierungs- und Färbungseigentümlichkeiten bedingen, auch vermutet er ähnliche Verhältnisse bei anderen pathogenen Kapselbildnern.

„negative Kapseln“ imponieren und vielfach fälschlich als wahre Kapseln angesprochen wurden (*Boni, Kühnemann, Marassini*). Wo daher Zweifel vorliegen, muß unbedingt die Forderung aufgestellt werden, daß die Kapseln „positiv“ gefärbt oder an lebensfeuchtem Material einwandfrei festgestellt werden (*Eisenberg*). Auch geht es nicht an, die durch verstärkte Färbung darstellbaren Höfe von koagulierten Nährbodenbestandteilen als Kapseln zu deuten, wie *Kern* es tat. Über Negativdarstellung der Kapseln s. weiter unten.

Auch das eigentliche Ektoplasma (so bezeichnet *Eisenberg* die Rindenschicht des Cytoplasmas) kann elektiv dargestellt werden (eventuell unter Mitfärbung der Membran). Das ist *Eisenberg* besonders bei grampositiven Arten mittels der modifizierten *Gram*- und *Claudius*-Methode, der *Viktoria*ablaumethode (modifizierte *Gram*-Methode) sowie der *Aurantia*-Methylviolett-Methode mit ihren Modifikationen gelungen. Alle diese Methoden gehören prinzipiell zur *Gram*-Methode, nur verwenden sie stärkere Differenzierungen (Chloroform, Alkoholaceton, *Aurantia*), wodurch das Endoplasma entfärbt wird, das Ektoplasma dagegen gefärbt bleibt. Die *Aurantia*-Methylviolett-Methode basiert auf dem Prinzip der Präokkupation, das Endoplasma wird hier vom *Aurantia* mit Beschlag belegt und dem Violett schwerer zugänglich gemacht, am Ektoplasma bildet *Aurantia* eine Verbindung mit dem nachfolgenden basischen Farbstoff.

4. Volutingranula. Mit diesem Namen hat *A. Meyer* körnchenartige Gebilde bezeichnet, die bei vielen Arten vorkommen und früher *Ernst-Babessche* oder metachromatische Granula benannt wurden. Der Stoff, aus dem sie bestehen und den *A. Meyer* sowie *Guilliermond* als eiweißartigen Reservestoff ansprechen, wurde *Volutin* benannt (vom *Spirillum volutans*, bei dem die Körnchen in großer Anzahl vorzukommen pflegen) und ist außer bei Bakterien bei verschiedenen Sproßpilzen, Pilzen, Algen, Cyanophyceen, Diatomeen und Protozoen gefunden worden, ja nach *Guilliermond* und *Marras* ist auch die basophile Substanz der Mastzellengranula bei Säugetieren hierher zu rechnen, nach *Beauverie* u. *Guilliermond* die Globoide in verschiedenen fetthaltigen Samen, sowie Körnchen in manchen Gramineensamen, wo sie als Reservestoffe fungieren, die beim Keimen verbraucht werden. Das *Volutin* ist in kaltem Wasser langsam, in heißem schnell löslich, durch Erhitzen, absoluten Alkohol oder Formalin wird es wasserunlöslich, es ist unlöslich in Alkohol, Äther, Chloroform, Pikrinsäurelösung, langsam löslich in gesättigter Chloralhydratlösung, löslich in verdünnten Säuren, Alkalien und Eau de Javelle, relativ trypsin- und pepsinfest. Nach *Dangeard* ist das „Metachromatin“ in den Zellen in Vakuolen in kolloidaler Lösung enthalten und soll erst durch Farbstoffe daraus niedergeschlagen werden (von *Guilliermond* bestritten). *A. Meyer* vermutet im *Volutin* eine Nucleinsäureverbindung (kein Nucleoproteid), und *Reichenow* hat am *Haematococcus pluvialis* durch

phosphorfreie Ernährung das Verschwinden der sonst zahlreichen Volutinggranula herbeigeführt, ebenso *van Herwerden* bei *Ustilago maidis*, *Torula monosa* und Hefe. Dem Volutin scheint im Haushalt der Bakterienzelle eine wichtige Rolle zuzukommen, jedenfalls wird es bei der Sporenbildung verbraucht (*Grimme*, *Amato*, *Guilliermond*, bestritten von *Henneberg*). *Henneberg* sieht darin den Träger von Zymase- und anderen Fermentwirkungen (dagegen spricht sich *van Herwerden* aus). Ob es als Äquivalent oder Derivat der Kernsubstanz zu gelten hat, wie von manchen angenommen wurde, läßt sich zurzeit nicht entscheiden. Von *Marx* u. *Woithe* ist ein enger Zusammenhang zwischen Ausbildung der Granula („Träger der Arteigenschaften und Erhalter der Art“) und Virulenzgrad der Bakterien angenommen worden; nach *Ficker*, *Krompecher*, *Ascoli*, *Schumburg*, *Gauß*, *A. Meyer* besteht ein solcher nicht. Es liegt jedenfalls näher mit letzterem anzunehmen, daß die Anhäufung von Reservestoffen ein Zeichen von Lebensenergie ist und von kräftiger Ernährung. Damit würde die Beobachtung von *Eisenberg* übereinstimmen, wonach in ein und derselben Kultur Individuen aus dichtem Belag körnchenfrei, solche aus gut isolierten Kolonien körnchenreich sein können, oder solche vom obersten, ange-trockneten Teil eines Agarröhrchens die Körnchen vermissen lassen, diejenigen vom unteren, feuchten sie aufweisen.

Färberisch sind die Volutinggranula durch vier Eigenschaften ausgezeichnet, die auch in ihren verschiedenen Darstellungsmethoden Verwendung finden. Sie sind erstens hyperchromatisch, indem sie ihnen zusagende Farbstoffe intensiver speichern, als der restliche Zelleib (mit Ausnahme der Vosporen). Diese Hyperchromasie offenbaren sie jedoch nur gegenüber gewissen Farbstoffen, u. zw. scheinen sie meist nur basischen Farbstoffen zugänglich zu sein (mit Ausnahme des Hämatoxylin); unter diesen aber bevorzugen sie dunkle Farbstoffe, sind also relativ cyanophil. Das geht daraus hervor, daß gewisse helle Farbstoffe sie überhaupt ungefärbt lassen (Chrysoidin, Neutralrot, Pyronin, Safranin, Phosphor, Chinolinrot, Fuchsin ohne Beizen, besonders in Gegenwart von Entfärbungsmitteln *Eisenberg*), sodann aber, daß man aus passend gewählten Gemischen von hellen und dunklen basischen Farbstoffen die Granula elektiv mit dunklen, den restlichen Zelleib mit den hellen färben kann (*Woskresenskij*, *Löffler*, *Eisenberg*, *Raskin*). Ferner haben die Granula die Eigenschaft, sich mit manchen Farbstoffen der Oxazin- und Thiazinreihe, auch mit Dahlia metachromatisch zu färben, was vielleicht mit einer lipoidartigen Komponente zusammenhängt (*Eisenberg*). Endlich entspricht der größeren Affinität für entsprechende Farbstoffe auch eine ziemlich große Echtheit der Färbung, die schwachen Säuren sowie anderen Entfärbungsmitteln (Formalin, Alkohol) in gewissen Grenzen standhält. Bei Färbung unfixierten Materials beobachtet man sehr oft eine starke Quellung der Granula, die ihre natürliche Gestalt und Größe beträchtlich verändert. Die Eigen-

schaften der Bakterien, an denen sie auftreten, beeinflussen die färberischen Reaktionen der Granula, so bei Säurefesten (s. oben). Bei *Gram-Negativen* sind sie gramnegativ, bei *Gram-Positiven* können sie positiv gefärbt werden (Diphtherie). Interessant ist dabei der Befund von *Jacobsthal*, daß den Diphtheriekörnchen durch siedendes Wasser ihre *Gram-Festigkeit* entzogen wird, während sie sonst kochfest ist. Mit dem Volutin wird hier also das *Gram-Substrat* herausgelöst.

Eine differentielle Färbung der Granula wird erreicht, indem man sie entweder kraft ihrer Metachromasie und Farbechtheit durch stärkere Färbung vom Rest des Bakteriums abhebt, oder indem man auf Grund der Metachromasie bzw. Cyanophilie sie durch abweichende Färbung hervortreten läßt. Die Hyperchromasie der Granula kommt zur Geltung nur bei diskreter Färbung, bei Überfärbung werden die Unterschiede zwischen den Granulis und dem Rest natürlich verwischt. Um Überfärbung zu vermeiden, wenden verschiedene Methoden Differenzierungen an, indem entweder Entfärber gleich der Farblösung beigemischt (meist Alkohol oder Essigsäure *Neisser*, *Bie*, *Trincas*, *Pugh*, *Ljubinsky*, Säurealkohol *Schauffler*, Formaldehyd *Eisenberg*, Milchsäure *Ficker*, Glycerin, Alkohol *Eisenberg*) oder die bereits gefärbten Bakterien in entsprechender Weise differenziert werden (Essigsäure *Hara*, Salzsäurealkohol *Piorkowski*, Tropäolin *Löffler*, Tropäolin und Bismarckbraun *Walter*, Formolalkohol *Sommerfeld*, starke Mineralsäuren, Chlorsäure, Jodsäure, Chromsäure, Eisenchlorid, Kaliumpermanganat, Antiformin, alkoholische Chinonlösung *Eisenberg*). Eine Intensitätsdifferenzierung kann man auch durch Verwendung stark verdünnter Farblösungen im progressiven Verfahren erzielen (z. B. Methylviolett $\frac{1}{10 \cdot 000}$, Mansonblau $\frac{1}{100} - \frac{1}{1000}$ *Eisenberg*). Umgekehrt muß man bei Verwendung von hellen Farbstoffen zu Beizen greifen, um sie an den Granulis zum Haften zu bringen, so z. B. läßt Fuchsin allein die Granula ungefärbt und muß als Carbofuchsin verwendet werden (*A. Meyer*, *Eisenberg*). Die Prägnanz der Färbung wird noch gesteigert, wenn man nachträglich lipoidlösliche Beizen einwirken läßt, wie Jod, Sublimat, Goldchlorid, wobei zugleich Alkohol die Differenzierung besorgt.

Will man Doppelfärbungen haben, so verwendet man zweckmäßig alkalische Methylenblaulösungen, *Romanowsky*-Gemische (*Giemsa*, *Leishman*, *Marino*, *Jenner*, *May-Grünwald*), Toluidinblau (*Pugh*, *Eisenberg*, *Ponder*), Dahlia (*Bie*), Dahlia-Methylgrün (*Neisser-Crouch*), Gentianaviolett (*Galesescu*), Krystallviolett (*Tribondeau* und *Dubreuil*), Nilblau oder Neumethylenblau (*Eisenberg*); auch hier muß Überfärbung vermieden werden, da sonst die Granula neben der metachromatischen Farbe auch den eigentlichen Farbstoff aufnehmen und so der Kontrast verwischt wird. Eine besondere Art von Metachromasie wird erzielt durch Jodbehandlung von Methylenblaupräparaten, es entsteht dabei in den Granulis (die zum Jod vielleicht infolge der Lipoid-

komponente eine Affinität zu haben scheinen) das braunschwarze Methylenblau-Jodhydrat, das vom Blaßblau des restlichen Zelleibs gut absticht (*Andrade, Wälsch, Gins, Quensel*). Die gebräuchlichste Form der Doppelfärbung kommt dadurch zustande, daß man entweder den durch die oben genannten Agenzien entfärbten restlichen Zelleib mit einer meist hellen Kontrastfarbe nachfärbt, oder indem man von der Kontrastfarbe auch die Entfärbung besorgen läßt. Angesichts der relativen Cyanophilie und Farbechtheit der Granula werden dazu meist helle basische oder saure Farbstoffe benutzt, die die ursprüngliche dunkle Farbe aus dem restlichen Zelleib, nicht aus den Granulis (denen helle Farbstoffe nicht zusagen) verdrängen. Von basischen Differenzierungsfarben seien hier erwähnt: Vesuvin (*Ernst, Neisser, Galesescu, Trincas, Ljubinsky, Falière, Tribondeau u. Dubreuil, v. Rovaert*), Chrysoidin (*Neisser II*), Fuchsin, Safranin, Neutralrot, Phosphin, Flavindulin, Rhodamin B, Pyronin, Auramin, Acridinrot, Acridinorange, Indulinscharlach, Magdalarot, Janusrot (*Eisenberg*), von sauren Eosin (*Löffler, Sommerfeld*), Chrysolin (*Okolska*), Rubin S (*Eisenberg*). Wie schon oben erwähnt wurde, gelingt die Doppelfärbung auch mittels Gemischen von hellen und dunklen entsprechend kombinierten Farbstoffen (z. B. Methylenblau-Eosin *Löffler*, Methylenblau-Fuchsin *Woskresenskij, Raskin*, Methylviolett-Safranin, Methylviolett-Neutralrot, Methylenblau-Safranin, Methylenblau-Chrysoidin *Eisenberg*). Ein ganz besonderes Prinzip wendet *Pitfield* an, indem er mittels Reduktion von Silbernitrat die Granula schwarz färbt, den restlichen Zelleib mit Fuchsin rot. Warum das Silbersalz nur in den Granulis reduziert wird, wäre interessant zu ermitteln (Reduktionsort *Unna?*): in ihnen soll nach *Conradi* auch Tellur auf seiner Tellurplatte durch Reduktion gespeichert werden. Bemerkenswert ist auch die von *A. Meyer* angegebene hyperchromatische Färbung des Volutins mit dem anorganischen Farbstoff Rutheniumrot (ammoniakalischem Rutheniumoxychlorid).

Im allgemeinen mag noch bemerkt werden, daß Granulafärbungen. (wie übrigens auch die anderen Differentialfärbungen) oft heikel und launisch sind (*Ficker, Eisenberg*), daß ihr Zustandekommen von der Beschaffenheit des Bakterienmaterials stark beeinflusst wird. Wenn wir bedenken, daß bei der Darstellung der Granula der Grad der färberischen Differenz zwischen ihnen und dem restlichen Zelleib ausschlaggebend ist, werden wir begreifen, daß ein und dieselbe Vorschrift bei einer Art gute, bei der anderen schlechte Resultate geben kann, und daß auch bei ein und derselben Bakterienart verschiedene Kulturen sich in dieser Hinsicht verschieden verhalten können, je nach Alter, Nährboden u. dgl. Die Zuverlässigkeit der Körnchenfärbung bei der Diphtheriediagnose (die ja übrigens auch nur beschränkt ist) wird gewährleistet dadurch, daß wir es immer mit einer Bakterienart zu tun haben, die aus demselben Milieu stammt, und auf gleichem Nährboden unter annähernd gleichen Bedingungen gezüchtet wird.

5. Kerne und andere Granula. Die Volutingranula wurden ebenso, wie andere granuläre Gebilde vielfach mit Kernen verwechselt, meist auf Grund unzureichender färberischer, mikrochemischer und morphologischer Analyse. Die Frage, ob bei Bakterien Kerne überhaupt vorkommen, bzw. welche morphologischen Bestandteile als solche anzusprechen wären, ist wie kaum eine andere von verschiedenen Seiten eifrig diskutiert worden, ohne daß bis jetzt eine Einigung darüber erzielt worden wäre (s. darüber bei *A. Meyer* sowie bei *Gottschlich*). Da die Frage nur zum Teil eine morphologisch-färberische ist, kann hier auf ihre Erörterung nicht näher eingegangen werden. Von den Färbemethoden wurden hier meistens Eisenhämatoxylin oder *Romanowsky*-bzw. *Giemsa*-Färbungen herangezogen, die freilich beide nur die Existenz von Chromatin, nicht aber diejenige von Kernen beweisen. *A. Meyer* verwendet zur Kernfärbung Formolfuchsin, außerdem hat er in unreifen Sporen bei verschiedenen Bacillenarten kernartige Gebilde mit Eisenhämatoxylin (Salzsäure- oder Säurealkohol-Differenzierung) und mit Methylenblau (stark verdünnt) nachweisen können, die im Gegensatz zum Volutin kochfest sind. Dieselben Gebilde hat dann *Eisenberg* (als „Sporenninnenkörper“ — auch bei reifen Sporen) mit Carbofuchsin, Pyronin, Methylviolett, Säurecyanin, Chinablau, Reinblau, Alkaliblau, Wollschwarz bei Differenzierung mit Säuren dargestellt, und *Ružička* berichtete später über ähnliche Erfolge. Identisch damit sind die „Sporenkerne“, die *Ilkewicz* mit Osmiumreduktion bei Milzbrandbacillen dargestellt hat.

Die „Polfärbung“ vieler gramnegativer Arten (besonders aus der Gruppe der hämorrhagischen Septicämie z. B. bei Pestbakterien) beruht auf Plasmolyse (*van Westenrijk*, *Lehmann* u. *Neumann*, *Eisenberg*). Zu ihrer Darstellung benutzt man am besten stark verdünnte (oder alkoholische *Hornicker*) Farblösungen, da im überfärbten Bakterium die Differenzierung verdeckt wird. Auch mit manchen sauren Farbstoffen sind schöne Polfärbungen zu erzielen (*Eisenberg*). *Hornicker* betrachtet die Polfärbung der Pestbakterien als Ausdruck einer „Anhäufung euchromatischer Substanz an den Polen“, was wohl nur als Umschreibung von Plasmolyse aufgefaßt werden darf. Die Bedeutung der plasmolyseartigen Bilder beim Diphtheriebacillus ist noch nicht aufgeklärt.

Als „Ochraceinkörnchen“ bezeichnet *Luska* gewisse Granula beim *Microc. ochraceus*, die mit Fett-, Volutin- und anderen Einschlüssen nicht identisch sind, mit dem Alter zu-, dann wieder abnehmende Säurefestigkeit aufweisen, und deren Bildung bzw. Zerfall in enger Abhängigkeit vom Stoffwechsel, insbesondere vom Kohlehydratstoffwechsel erfolgt. Ihre Substanz ist unlöslich in Alkohol, Äther, Chloroform, schwachen Laugen und Mineralsäuren, auch in kochendem Wasser, sie ist gramnegativ, eosinfärbbar.

6. Fett, Granulose, Glykogen. Von diesen Reservestoffen ist der erste der wichtigste und am meisten verbreitete. Fettkörnchen sind vielfach schon ihrem Aussehen nach in Bakterien vermutet worden, auch gehören hierher wahrscheinlich viele als „Vakuolen“ beschriebene Gebilde. Mikrochemisch sind sie nach *A. Meyer* charakterisiert durch Löslichkeit in Eisessig, gesättigter Chloralhydratlösung, Verseifbarkeit, Resistenz gegen Eau de Javelle, fehlende Schwärzung durch Osmiumsäure, Braunfärbung durch Jod. Die chemische Zusammensetzung ist noch wenig bekannt, dürfte auch von Art zu Art, vielleicht auch bei ein und derselben Art in verschiedenen Stadien wechseln, es steht nicht einmal fest, ob reine Neutralfette vorliegen, oder ob dabei, was wahrscheinlicher erscheint, noch andere fettartige Körper beigemengt sind. Die färberische Darstellung der Fetteinschlüsse verwendet zum Teil indifferente reine Fettfarbstoffe, die hier als mikrochemische Reagenzien fungieren, zum Teil andere Färbungen, die auf den physikalischen Lösungsaffinitäten der Einschlüsse beruhen. Zu den ersteren gehören Dimethylamidoazobenzol (Buttergelb), Sudan III, Scharlach R, Alcannin, alle in alkoholischer Lösung (*A. Meyer* und seine Schüler). *Eisenberg* fand die Färbung mit beiden ersteren wenig ausgeprägt, Alcannin, Cyanin, Scharlach R versagten, dagegen gab Indophenolblau schöne, aber vergängliche Blaufärbung. Schön, aber weniger elektiv sind Färbungen mit Sudanbraun sowie Vesuvin B. Alle diese Färbungen werden ebenso wie die folgenden am besten am lebendfeuchten Material ausgeführt, am angetrockneten gelingen sie kaum, wahrscheinlich infolge der schlechten Permeabilität der getrockneten Bakterien für die fettlöslichen Stoffe. Die Indophenolblaufärbung kann auch nach *Dietrich* u. *Liebermeister* durch Synthese des Farbstoffs (fälschlich auch Naphtholblausynthese benannt!) aus Dimethylparaphenylendiamin und α -Naphthol im Präparat selbst erzielt werden und wurde diese Reaktion als Beweis für die Oxydasefunktion der Granula aufgefaßt (s. *Kramer-Brandt* auch weiter unten).

Zur zweiten Gruppe der Fettfärbungen sind vor allem die Färbungen von manchen Farbbasen zu rechnen, die lipoidlöslich sind und einen anderen Farbenton aufweisen als ihre Farbsalze, also mit der Base des Chrysoidin, Vesuvin, Echtblau, vor allem aber mit der Nilblaubase. Es wird entweder mit der fertigen Base in alkoholischer Lösung gefärbt, oder es wird dieselbe aus dem Farbsalz mittels Alkalien im Präparat selbst entwickelt. Beim Nilblau ist auf letztere Weise eine schöne Doppelfärbung zu erzielen (Bakterien blau, Fett orangerot) (*Eisenberg*). Ähnliche Färbungen geben andere Oxazine wie Neumethylenblau und Brillantkresylblau:

Auf der Lipoidlöslichkeit der dabei verwendeten Beizen beruht auch eine Reihe anderer Färbungen. Bei der Vorbeizung speichern dabei die Fetteinschlüsse die lipoidlöslichen Beizen; wird dann eine schwache Lösung eines entsprechenden basischen Farbstoffs zugesetzt, so bildet

sie mit der Beize eine lipoidlösliche Verbindung, die von den Fettkörnchen in Lösung gehalten wird. Der restliche Zelleib bleibt dabei ungefärbt oder wird nur schwach mitgefärbt (*Eisenberg*). Als Beizen kommen hier in Betracht α - und β -Naphthol, Phenol, o-Chlorphenol, Phenylacetat, alle in alkalischer Lösung, Jod, Pikrinsäure, viele Nitrokörper der aromatischen Reihe, Sublimat, Goldchlorid (nicht andere lipoidunlösliche Metallsalze), als Farbstoffe Rosaniline, Pararosaniline, Methylrosaniline, Anilingrüne. Positive Erfolge (wenn auch nicht ganz strikt elektive infolge Zerlegung der Verbindung durch den Zelleib) werden ebenfalls erzielt bei Färbung mit alkoholischen Lösungen der wasserunlöslichen Jod- bzw. Pikrinsäureverbindungen der genannten Farbstoffe. Auch andere Nitrofarbstoffe, wie Aurantia, Martiusgelb, Naphtholgelb, geben mit manchen basischen Farbstoffen wasserunlösliche neutrale Verbindungen, die in alkoholischer Lösung zur Fettfärbung sich eignen. Hierher wäre wohl auch die Fettfärbung nach der *Tarchettischen* Methode zu rechnen (Carbolfuchsin—alkoholische Pikrinsäure, ursprünglich für Säurefeste angegeben) (*Eisenberg*). Eine Spiegelfärbung der Granula, ungefärbte Kugeln umgeben von dunkelblau-violetten Schalen, bekam *Eisenberg* mit Hilfe einer *Gram-Modifikation* (Viktoria-blaumethode) an angetrocknetem Material. Endlich wäre noch die Rotfärbung der Granula mit Pikrocarmin und Boraxcarmin zu erwähnen (bei Meeresbakterien nach *Schepotieff*).

Glykogen- und Granulose-(Iogen- oder β -Amylose-)Einschlüsse sind nur mikrochemisch feststellbar, eine färberische Darstellung ist bis jetzt nicht gefunden worden.

Als Plastinkörnchen bezeichnet *Schepotieff* bei manchen Meeresbakterien vorkommende Granula, die in Magensaft, Trypsin, 10%iger Salzsäure und 3%iger Kalilauge unlöslich sind, in Essigsäure stark quellen, mit Bismarckbraun, Methylgrün, Thionin und Toluidinblau ungefärbt bleiben, mit Gentianaviolett sehr schwach, mit Bleu de Lyon und Lichtgrün blau, mit Eosin hellrosa, mit Orcein, *Giemsa-Blau* und nach *Biondi-Heidenhain* sich rot färben. Dem Plastin mißt dieser Autor in Anlehnung an *Ružička* eine große Bedeutung als Träger der Vererbung bei (?).

7. Über die färberische Differenzierung verschiedener physiologischer Zustände und Funktionen der Bakterien. Haben schon die bisher besprochenen differentiellen Färbungen der Bakterien uns gezeigt, daß wir von einer Mikrochemie der Bakterienzelle noch weit entfernt sind und daß die durch Färbung über sie gewonnenen Aufschlüsse nur mit großer Vorsicht zu verwerten sind, so gilt das umsomehr von den jetzt zu erörternden Methoden. Verhalten sich unter sonst gleichbleibenden Bedingungen zwei Individuen einer Bakterienart färberisch different, so ist wohl der Schluß erlaubt, daß hier verschiedene Lebenszustände vorliegen; welcher Art sie sind, wird man dabei meist aus Vergleichen im allgemeinen mutmaßen können, sichere Aufschlüsse

kann die Färbung darüber nicht liefern. Relativ am klarsten liefern Aufschlüsse die schon beschriebenen Vorgänge der Sporen- und Fettbildung, wenn auch hier die genaue Kenntnis des stofflichen Geschehens aussteht.

Zunächst ist festzustellen, daß Bakterien in verschiedenem Alter sich verschieden färben können. Grampositive Bacillen sind im Jugendstadium (Schwärmer) gram- und säurefester, als in dem darauffolgenden Ruhe- und Sporangienstadium (*Grimme*). Vermittels seiner Aurantia-Methylviolett-Methode (Vorfärbung mit methylalkoholischem Aurantia, dann kurz wässriges Methylviolett) konnte *Eisenberg* bei verschiedenen grampositiven (weniger typisch bei gramnegativen) Arten zwei Stadien unterscheiden, die wahrscheinlich mit den soeben erwähnten zusammenfallen. Im ersten erscheinen die Bakterien homogen stark violett gefärbt, im zweiten weisen sie um einen gelb gefärbten Innenteil einen violetten Ektoplasmasaum auf. Dauer des ersten Stadiums sowie die Raschheit und Vollständigkeit seines Umschlags ins zweite wechseln von Art zu Art sowie von Kultur zu Kultur, je schnellerbiger eine Art, desto früher erfolgt er. An Stelle von Aurantia können andere Nitrokörper, an Stelle des Methylvioletts andere basische Farbstoffe (Fuchsin, Methylenblau, Nachtblau, Viktoriablauf u. a.) benutzt werden. Durch mäßiges Erhitzen jungen Kulturmateriels konnten im ersten Stadium befindliche Bakterien dazu gebracht werden, die Reaktion des zweiten zu geben. Interessant ist, daß in Übereinstimmung mit dieser Cyanophilie der jugendlichen Bakterien auch bei tierischen Geweben vielfach unreife Jugendstadien cyanophil sind im Vergleich zu den reiferen erythro- oder xanthophilen (*Pappenheim*).

Mit der besonderen Beschaffenheit des „Jugendstadiums“ hängt wohl auch die von *Zimmermann*, *Czaplewski*, *Eisenberg* gemachte Beobachtung zusammen, daß manche gramnegative Arten in diesem Alter einen beträchtlichen Grad von Gram-Festigkeit aufweisen (*Bacterium pestis*, *Bacterium coli*, *Bacterium pneumoniae*). Auf der Koexistenz verschiedener Entwicklungsstadien beruht auch wahrscheinlich die von *Eisenberg* bei manchen Arten festgestellte Erscheinung, daß besonders bei diskreter Färbung bzw. bei Differenzierung dunkler Färbungen mit hellen Farbstoffen neben stark gefärbten Individuen mäßig und schwach gefärbte (bzw. in der Kontrastfarbe gefärbte) zu sehen sind, u. zw. desto mehr, je älter die Kultur. Eine Differenzierung jüngerer und älterer Individuen lieferten auch die Modifikationen der *Claudius*- bzw. Gram-Methode von *Kronberger*, wobei die jungen die ursprüngliche dunkle Farbe stärker festhalten, die älteren schwächer oder sie sogar abgeben, um die Kontrastfarbe aufzunehmen. *Kronberger* färbt mit Methylenblau bzw. Gentianaviolett, beizt und differenziert mit *Essbachs* Reagens und färbt mit Eosin nach. Seine Folgerung, daß jüngere Bakterien mehr basophil, ältere mehr acidophil sind, erscheint nicht ganz begründet, es könnte sich nämlich im Sinne der im allgemeinen Teil angeführten

Erörterungen von *Pappenheim* um rein physikalische Elektion, u. zw. Verdrängung dunkler Farbstoffe durch einen hellen handeln.

Endlich ist hier die Angabe von *Yamamoto* anzuführen, wonach junge Milzbrandbacillen „silbernegativ“ sind, während ältere mit Silber diffus geschwärzt werden; bei der Sporulation erscheint die Vospore als schwarzer allmählich wachsender Fleck unter Aufhellung des restlichen Bacillenleibs.

Die hier schon relativ früh zum Ausdruck kommenden Veränderungen der Bakterien erfahren eine weitere Steigerung bei der Degeneration in alternden Kulturen und so kommt es, daß solche an *Gram*-Festigkeit einbüßen oder sie ganz verlieren (*Czaplewski*) und auch mit gewöhnlichen Methoden immer schlechter sich färben. Auffallend ist, daß auch in solchen Kulturen einzelne seltene Individuen intakte Färbbarkeit bewahren, zuweilen sogar hyperchromatisch sich färben, es sind dies vielleicht die „Ausnahmezellen“ von *Kruse*, die die Fortzüchtungsmöglichkeit solcher sonst abgestorbenen Kulturen gewährleisten. Was für physikalische bzw. chemische Veränderungen diese Umstimmung der Färbbarkeit bedingen, ist nicht leicht zu sagen, experimentell läßt sie sich an jungen Bakterien durch Erhitzen oder andere Oxydationsmittel bewirken (*Gabritschewsky*, *Hieroclès*, *Guerbet-Mayer-Schäffer*, *Eisenberg*).

Hierher wären auch jene Methoden zu rechnen, die die Darstellung der Oxydasegranula zum Zweck haben und die wir bereits oben als Methoden zur Färbung von Fetteinschlüssen kennen gelernt haben. *Dietrich* u. *Liebermeister* haben die *Winklersche* (*Röhmman-Spitzersche*) Indophenolsynthese bei Bakterien angewandt und deuten die damit sich blau färbenden Körnchen der Milzbrandbacillen als Sauerstoffüberträger, ebenso nach ihnen *Kramer* und *Brandt*. Daß dabei das sich bildende Indophenolweiß zu Indophenolblau oxydiert wird, unterliegt keinem Zweifel; ob jedoch die gefärbten Granula wirklich der Ort der Sauerstoffübertragung sind, dürfte nach *Eisenberg* nicht als sicher erwiesen gelten, denn wo immer die Oxydation zu Indophenolblau in der Zelle erfolgen würde, könnte das entstehende Blau dank seiner Lipoidlöslichkeit elektiv die aus Lipoiden bestehenden Granula färben. Ähnliche Bedenken haben bezüglich analoger Reaktionen in tierischen Geweben *Fursenko* sowie *Oelze* geltend gemacht. Auch die Reaktion mit Rongalitweiß (Leukomethylenblau), das an der Oberfläche der Granula gebläut wird (Oxydation zu Methylenblau nach *Brandt*) läßt die Deutung zu, daß die Oxydation irgendwoanders in der Zelle stattfindet, und daß um die Granula herum eine verdichtete Protoplasmaschicht das entstehende Methylenblau stärker speichert. Man wird also bis auf weiteres diesen Nachweis einer biochemischen Leistung von Zellbestandteilen noch nicht als erbracht betrachten dürfen.

Endlich wären hier noch Methoden zu erwähnen, die den Zweck verfolgen, lebende Bakterien von toten zu unter-

scheiden. Früher hatten bereits *Semenowicz* u. *Marzinowsky*, *Kischensky* sowie *Knaak* bei verschiedenen Fuchsin-Methylenblau-Kombinationen gefunden, daß normale Bakterien sich blau oder blau-violett, degenerierte rot färben. *Proca* gibt nun an, daß man durch Färbung mit Methylenblau-Fuchsin (simultan oder sukzessiv) unterscheiden kann, ob die Bakterien im Moment des Antrocknens lebend oder tot waren, indem die ersteren blau, die letzteren rot sich färben. Analoge Differenzen will *Proca* bei Sporen gefunden haben, auch glaubt er mit seiner Methode virulente Bakterien von avirulenten unterscheiden zu können. Nachprüfungen von *Kayser* sowie von *Steinschneider* haben ergeben, daß zwar im großen und ganzen lebende und tote Bakterien im oben genannten Sinne sich differenzieren lassen, daß jedoch zuweilen nur geschädigte aber noch vermehrungsfähige Bakterien bereits den Färbungsumschlag aufweisen, sowie daß die Methode nicht konstant genug arbeitet und nicht so zuverlässig ist, daß man sie zur Entscheidung wichtiger Fragen heranziehen könnte. Daß Virulenzunterschiede sich im färberischen Verhalten ausdrücken sollten, erscheint schon a priori wenig wahrscheinlich, ebenso, wie z. B. die Angabe von *Spengler* sowie *Kronberger*, daß der Virulenzgrad der Tuberkelbacillen nach dem Farbenton der sog. „Sporen“ (Granula) beurteilt werden kann oder die Beurteilung des Virulenzgrades nach der Anzahl der Volutinggranula (*Marx* u. *Woithe*). Die von *Ružička* für verschiedene Organismen angegebene Differentialfärbung zwischen lebenden und toten Zellen (Vitalfärbung mit einem Gemisch von Neutralrot und Methylenblau) gibt nach seinen Angaben bei Bakterien wenig prägnante Resultate, indem lebende Bakterien rötlich-violett, abgestorbene bläulich-violett gefärbt erscheinen. Zur Unterscheidung lebender und toter Leprabacillen in leprösen Produkten wendet *Unna* seine Thymen-Viktoriablau-Methode an. Die mit Thymen-Viktoriablau gefärbten Schnitte werden dabei mit Salpetersäure und Alkohol differenziert, mit Safranin nachgefärbt und dann nochmals differenziert. Lebende Bacillen färben sich blau, abgestorbene gelb, ähnlich wie etwa durch Degeneration ihrer Säurefestigkeit verlustig gegangene Tuberkelbacillen mit Kontrastfarben dargestellt werden können (*Unna*, *Delbanco*). In neuester Zeit endlich hat *Nyfeldt* gefunden, daß tote Bakterien sich durch Silbernitrat schwärzen lassen, während lebende silberresistent sind. Bemerkenswert ist bei diesen Methoden, daß tote Bakterien im Vergleich zu lebenden xantho- bzw. erythrophil sind, ebenso wie oben ältere Bakterien im Vergleich mit jungen („Jugendreaktion“ von *Eisenberg*). Es wäre sicher erwünscht, über den Mechanismus all dieser Differenzierungen genauere Aufschlüsse zu erlangen.

8. Eine wenn auch nur kurze Besprechung verlangt ferner die **Bedeutung des Substrats** für die Methoden und Resultate der Bakterienfärbung. Daß gewöhnliche Bakterienausstriche andere Färbungsprozeduren erfordern, als Bakterien in Gewebsstücken oder Schnitten,

ist ohneweiters aus physikalischen Gründen verständlich, indem die größere Dicke der Objekte die Anwendung stärkerer Farblösungen bzw. längere Färbungsdauer, dafür aber auch meist längere oder stärkere Differenzierung erfordert. Außerdem aber macht sich bereits hier ein anderer Faktor bemerkbar, nämlich die Konkurrenz zwischen Bakterien und Substrat um den Farbstoff. Hier trifft es sich nun insofern glücklich für den Bakteriologen, als die Affinität der Bakterien für basische Farbstoffe (auf die es ja hauptsächlich dabei ankommt), etwas größer ist, als diejenige von Gewebskernen, die ebenfalls wie die Bakterien basophil sind, und weit größer als diejenige des Protoplasmas. Schwierigkeiten können unter Umständen die γ -(Mastzellen-)Granula bereiten, deren Basophilie und Chromatophilie derjenigen der Bakterien nahesteht und die daher oft fälschlich für Kokken gehalten wurden. (Eine Unterscheidung ermöglicht die absolute Basophilie der Granula, während diejenige der Bakterien nur relativ ist.) Auch bei der Färbung der Mikroorganismen in der Haut kann die Hyperchromasie und die relative *Gram*- und Säurefestigkeit des Horngewebes eine elektive Darstellung von Bakterien erschweren. Daß in gewissen Medien ausgestrichene Bakterien gram- bzw. säurefest erscheinen können, obwohl sie es für gewöhnlich nicht sind, ist schon oben erwähnt worden. Ein großer Vorzug der *Gram*-Methode ist, daß Kerne dabei leichter entfärbt werden, als gramfeste Bakterien; wo dies nicht ganz eindeutig bei Verwendung von reinem Alkohol erfolgt, gelingt es durch stärkere Entfärber wie Acetonalkohol nach *Nicolle*, bzw. Chloroform bei der *Claudius*-Modifikation, die Entfärbung der Kerne bei erhaltener Färbung der *Gram*-Festen zu erreichen.

Nur zum Teil gehören hierher Veränderungen der Färbbarkeit der Bakterien im infizierten tierischen Organismus. Ein Teil davon ist auf rein physikalische Faktoren zurückzuführen, denn in Serum oder Organsäften aufgeschwemmte und sofort fixierte Bakterien zeigen ebenfalls erhöhte Chromatophilie und verstärkte Entfärbungsresistenz. Wichtiger aber sind andere Veränderungen, die dynamischer Natur sind, und auf oft intensiven Wechselwirkungen zwischen dem Eindringling und den Abwehrkräften des Organismus beruhen. (Näheres darüber s. im Artikel von *Eisenberg*: Über morphologische Veränderungen der Bakterien bei der Infektion und Immunität in *Kraus-Levaditis'* Handbuch, 2. Auflage.) Wir finden einerseits Verdickung und Hyperchromasie der Bakterien als Ausdruck einer Hypertrophie der „tierischen“ Bakterien (*Preiszl, Bail, Eisenberg, Bail u. Rubritius, Tsuda*), anderseits aber degenerative Vorgänge, die mit herabgesetzter Färbbarkeit bzw. verminderter *Gram*- und Säurefestigkeit einhergehen und die dadurch auch eine große Bedeutung für die Bakteriendiagnose haben (*Radziewsky, Eisenberg, Nowak, Fränkel u. Pfeiffer, Emmerich u. Saida, Löwit, Szuman, Kisskalt, Deutsch, Jarotzky*).

In vielen Fällen erfolgt die Herabsetzung der Färbbarkeit nicht gleichmäßig an der ganzen Bakterienzelle, sondern betrifft elektiv nur gewisse Teile davon (z. B. *Eisenberg*, *Nowak*, *Suzuki*). Interesse verdienen ferner sowohl vom theoretischen als auch vom praktischen Standpunkt die färberischen Veränderungen, die Bakterien bei der Phagocytose erfahren. Dieselben fallen zum Teil mit den degenerativen Vorgängen zusammen, die unter dem Einfluß der tierischen Säfte extracellulär erfolgen (Bakteriolyse u. a.), zum Teil aber sind sie eigenartiger Natur. *Metschnikoff*, *Mesnil*, *Bordet*, *Salimbeni*, *Gheorgkiewsky*, *v. Hübner* haben an verschiedenen phagocytierten Bakterien eine Änderung der färberischen Affinität beobachtet, die sie als „Eosinophilie“ bezeichnen, und die darauf beruht, daß solche Bakterien die Eosinfärbung trotz Methylenblauanfärbung beibehalten, während normale die letztere annehmen. Es ist bis jetzt unentschieden, ob hierbei ein Umschlag von Basophilie zur Acidophilie oder von Cyanophilie zur Erythrophilie vorliegt, ebenso, was diesen Umschlag bewirkt. Vielleicht wirkt der saure Saft der Leukocytenvakuolen (*Metschnikoff*) als Beize für den Säurefarbstoff (*Eisenberg*). Eine andere mehrfach beobachtete Erscheinung ist die Hyperchromasie und Metachromasie intracellulärer Gonokokken. So fand *Plato* bei Vitalfärbung mit schwacher Neutralrotlösung nur die intracellulären Kokken gefärbt, nicht die extracellulären. Über ähnliche Befunde berichten *Wahl*, *v. Leszczynski*, *Pick* u. *Jacobsohn*, *Lanz*, *Bitter*, *Kindborg*. Dagegen scheint bei chronischen Gonokokkenprozessen die Färbbarkeit der Kokken zu leiden und dieselben erfordern dann zur Darstellung verstärkte Färbemethoden (*Glück*).

Anhang.

Negativdarstellung der Bakterien.

Die Färbung der Bakterien erfordert mehr oder minder komplizierte Prozeduren und hängt zum Teil auch von ihrer veränderlichen Färbbarkeit ab; ist dieselbe stark lädiert, so können dieselben nur schlecht sichtbar gemacht werden oder ganz dem Nachweis entgehen. Die Beobachtung in ungefärbtem Zustand weist diesen Übelstand nicht auf, ist jedoch etwas mühevoll und heikel, auch reicht sie für viele Details nicht aus. Man hat deshalb versucht, die Vorteile beider Methoden dadurch zu verbinden, daß man ungefärbte Bakterien mit einem gefärbten Medium umgab, in dem sie sich als helle Lücken scharf abheben. Statt der positiven Darstellung gefärbter Objekte auf farblosem oder andersgefärbtem Grund haben wir hier eine Negativdarstellung durch Kontrast der ungefärbten Lücke und des gefärbten Grundes.

In der Botanik wurde seit mehr als zwei Jahrzehnten zu diesem Zweck flüssige Tusche verwendet, in der man das unfixierte Material untersuchte (*Bütschli* Diatomeen, *Molisch* Purpurbakterien). *Schewiakoff*

beobachtet die Bewegung lebender Gregarinen in flüssiger Tusche, *Certes* empfiehlt zur Beobachtung von Protisten eine Lösung von Anilinschwarz, *Fabre-Domergue* eine solche von Diphenylaminblau. *Hamm*, *Errera* und nach ihnen *Arzt* haben flüssige Tusche sowie 1% ige Collargollösung mit Erfolg zum Studium der Kapseln an unfixiertem Material verwendet, ebenso *A. Meyer* flüssige Tusche zur Untersuchung der schleimigen Außenschicht der Membran beim *Bacillus tumescens*. Neben dieser Methode hat die Negativdarstellung in den letzten Jahren große Verbreitung und vielfache Anwendung gefunden in der sehr handlichen und einfachen Form des *Burr'schen* Tuscheverfahrens. Das zu untersuchende Material (es können Bakterienkulturen, tierische Säfte oder Exkrete sein) wird in flüssiger Tusche aufgeschwemmt, in dünner Schicht ausgestrichen und getrocknet, worauf das Präparat zur Untersuchung fertig ist. *Burri* verwendet sog. Pelikantusche Nr. 541 von *Günther* u. *Wagner*, Hannover-Wien (sehr gleichmäßiges, empfehlenswertes Präparat, Kriegsproben von dieser wie von anderen Marken waren leider wenig befriedigend; steril zu beziehen von Doktor *G. Grübler & Co.* in Leipzig) in 10facher wässriger Verdünnung sterilisiert und zwei Wochen lang sedimentiert. *Gins* findet eine Verdünnung von $\frac{1}{2}$ vorteilhafter (ebenso *Ref.*), die er durch langes Zentrifugieren sedimentiert und sterilisiert; zum Ausstreichen bedient er sich des *Wright'schen* Spreaders. Nach den Erfahrungen des Referenten kann man auch mittels Deckglases oder einer Objektträgerkaute oder mittels capillar ausgezogener Glasnadeln sehr dünne und gleichmäßige Ausstriche bekommen. Auf Sterilisierung und Sterilhalten der Tusche muß sorgfältig geachtet werden, da die in ihr enthaltene Leims substanz Wuchern von Bakterien und Hefen (besonders Kapselbakterien!) ermöglicht, die zu Verwechslungen Anlaß geben können (*Hadley*, *Bryant*, *Elkins*). Zur Sterilhaltung wird von *Gins* Formaldehydzusatz empfohlen. Tusche ist eine Aufschwemmung feinsten Kohlepartikelchen (Lampenruß) in einer Leimlösung, also kein Farbstoff, kann demnach auch in Bakterien nicht eindringen, dieselben erscheinen vielmehr als helle, scharf konturierte Lücken auf dem braunen, ganz fein granulierten oder homogenen Hintergrund. Besonders geeignet erscheint die Tuschemethode zur Darstellung ganz feiner und schwer färbbarer Bakterien, vor allem der *Spirochaeta pallida* (und *pertenuis*) (*Burri*, *Frühwald*, *Eisenberg*, *Hecht* u. *Wilenko*, *Gins*, *Plaut*, *Mulzer*, *Lipschütz* u. a.). Bei der Feinheit des Objekts muß hier ganz besonders auf eine dünne Schicht geachtet werden, da sonst die Tusche den dünnen Spirochätenleib überbrückt und verdeckt, wie sie es z. B. normalerweise mit den Geißeln tut. Wenn auch die Methode des Spirochätennachweises nicht absolut beweisend ist bei negativem Resultat und dann durch Dunkelfelduntersuchung ergänzt werden muß, eignet sie sich wie keine andere zur klinischen Schnelldiagnose. Die naheliegende Hoffnung, mit der Tuschemethode Bakteriengeißeln zur Anschauung zu bringen, hat sich

leider nicht erfüllt; nur Geißelzöpfe werden zuweilen in ganz jungen Kulturen von Typhus, Paratyphus, Proteus im Tuschebild gefunden (*Gins*). Von sonstigen Zellbestandteilen sind Sporen, Fetttropfen, zuweilen auch Volutingranula durch ihre besondere Lichtbrechung kenntlich (*Eisenberg*). Die Bakterien erscheinen im allgemeinen etwas größer als im gefärbten Präparat, weil beim Trocknen die Tuscheschicht dem schrumpfenden Bakterienleib nicht folgen kann und so die Lebensgröße fixiert (vielleicht erscheinen sogar die Tuschelücken zu groß infolge der Retraktion der Tuscheschicht).

Eine interessante Eigentümlichkeit der Tuschemethode ist von *Eisenberg* festgestellt worden. Grampositive Arten weisen nämlich, besonders an dünnen Stellen einen Hof kondensierter Tusche um sich herum auf („Attraktion“), den gramnegative vermissen lassen, eine Erscheinung, die auf besondere kolloidchemische Eigenschaften ihrer Membran hinweist und mit der späterhin von *Eisenberg* festgestellten größeren Adsorbierbarkeit der Positiven gut übereinstimmt. Die gramnegativen Bakterien dagegen zeigen meist in der Mitte oder näher dem Rand ein rundes oder ovoides, braunschwarzes Gebilde auf, das seitwärts bis fast an den Rand sich erstreckt, nach den Polen zu aber nicht so weit reicht, indem es für zwei helle, leuchtende Polgebilde Platz läßt. Gramnegative Kokken (Gonokokken, Meningokokken, *M. catarrhalis*) verhalten sich wie ihre grampositiven Verwandten. Als Ursache dieser eigenartigen Differenzierung, die später auch von *Sangiorgi* gefunden wurde, betrachtet *Eisenberg* die beim Antrocknen erfolgende Plasmolyse der gramnegativen Bakterien bekanntlich erfolgt dabei Retraktion des Protoplasten nach den Polen zu, in der Mitte des Bakteriums entsteht eine nur von der kollabierten Membran gebildete Delle, die von Tusche ausgefüllt wird (von außen) und so als dunkler Innenkörper imponiert. Damit stimmt das Ausbleiben der Differenzierung bei grampositiven Arten. Die von *Bley* sowie *Shimidsu* behauptete ähnliche Differenzierung von Milzbrandbacillen und Streptokokken konnte *Eisenberg* nicht bestätigen. Was *Bley* dafür ansah, waren bei Milzbrand wahrscheinlich durch Degeneration kollabierte leere Membranhüllen, die jedoch von der Differenzierung der Gram-Negativen gut unterscheidbar sind. Zur Auffassung von *Eisenberg* stimmt ferner die von *Sangiorgi* festgestellte und von *Eisenberg* bestätigte Tatsache, daß in alten Kulturen viele Individuen nicht differenziert erscheinen (weil abgestorben und zur Plasmolyse nicht mehr befähigt) sowie daß auf verschiedene Weise abgetötete Bakterien die Differenzierung vermissen lassen.

Shimidsu hat später die von *Eisenberg* sowie *Sangiorgi* beobachteten Tatsachen an Tusche-, Sepia- und Berlinerblaupräparaten bestätigen können. Auch er kommt zur Überzeugung, daß das dunkle Zentralgebilde einer mit Tusche erfüllten Zentraldelle entspricht. Seine Behauptung, eine ähnliche Zentralvertiefung an lebenden Bakterien im

hängenden Tropfen (eventuell Tuschetropfen) beobachtet zu haben, wird wohl manchem Zweifel begegnen, ebenso die Berufung auf Diplokokkenbilder von Bakterien im Dunkelfeld (wahrscheinlich Beugungserscheinungen!), die die Präexistenz der Delle beweisen soll. Auch *Heim* spricht sich in der neuesten Auflage seines bekannten Handbuchs gegen die von *Shimidsu* geäußerte Ansicht einer präformierten, starren, bikonkaven Gestalt der Bakterien aus und vermutet wohl mit Recht die Entstehung der Vertiefung erst beim Antrocknen der Bakterien durch Retraktion des Protoplasten, eventuell Plasmolyse.

Als Ersatz für Tusche hat *Nitsche* eine 10%ige Collargol-Lösung (von *Heyden*, Radebeul bei Dresden) empfohlen, die Technik weicht von der *Burr*schen nicht ab, nur ist die Haltbarkeit der Präparate etwas begrenzt. Die Methode ist auch zur Darstellung der *Pallida* geeignet, was von *Harrison* bestätigt wurde. Auch die Attraktionshöfe um grampositive Bakterien, ebenso wie die Differenzierung der gramnegativen hat *Eisenberg* im Collargolpräparat wieder gefunden.

Einen weiteren erfolgreichen Schritt auf dem Gebiet der Negativdarstellung machte *H. Fischer*, indem er vorschlug, die Bakterien in Lösungen saurer Farbstoffe auszustreichen, die sie nicht anzufärben vermögen, so daß die Bakterien farblos auf gefärbtem Grund erscheinen. Er verwendete gesättigte wässrige Lösungen von Anilinblau, Säurefuchsin, Kongorot, Nigrosin, die beiden letzteren gaben die besten Resultate. *Eisenberg* ging noch einen Schritt weiter, indem er dieses Prinzip mit einer Differentialfärbung kombinierte. Er verwendet ein Gemisch gesättigter Lösungen zweier Säurefarbstoffe des Chinablaus und des Cyanosins (als „Cyanochin“ bei Dr. G. Grüber & Co. Inhaber Dr. K. Hollborn in Leipzig vorrätig). Die Technik des Ausstreichens ist mit derjenigen bei Tusche oder Collargol identisch. Auf dem sattvioletten Hintergrund erscheinen grampositive Bakterien (auch die gramnegativen Kokken) als farblose oder blaßrosa bis rot gefärbte Lücken, umgeben von einem Hof verdichteten Farbstoffs („Attraktion“, besonders gut an dünnen Stellen sichtbar). Um die Gram-Negativen herum ist der Hintergrund ganz homogen, sie selbst weisen die schon bei Tusche beschriebene plasmolytische Differenzierung auf. Die Färbung der Gram-Positiven beweist ihre größere Permeabilität für Cyanosin (ebenso wie für basische Farbstoffe), jedoch nehmen es nicht alle Arten gleich leicht auf, auch bei ein und derselben Art scheint die Aufnahmefähigkeit nach dem biologischen Zustand zu wechseln. Werden die Bakterien durch vorheriges Antrocknen oder Erhitzen geschädigt, so nehmen nicht nur alle Gram-Positiven das Cyanosin auf, sondern auch die Gram-Negativen; diese letzteren weisen dann einen matten, verschleierten Farbenton auf. Sporen, Fettropfen, Kapseln treten im Cyanochinbild (ungefärbt) sehr schön hervor, auch Spirochäten lassen sich gut darstellen. Die Methode hat vor den anderen Negativmethoden

den Vorteil, daß sie eine ziemlich weitgehende Differenzierung der Bakterien bei großer Einfachheit der Ausführung ermöglicht. Sauer reagierende Substrate, ebenso salzreiche müssen hier ebenso wie auch bei der Tusche und beim Collargol vermieden werden, da sonst durch Ausflockung der Hintergrund seine Homogenität einbüßt und das Bild undeutlich wird.

Neuerdings empfahl *Knack* eine wässrige übersättigte Lösung von Nigrosin B (schon von *H. Fischer* angewandt) zur Negativdarstellung von Blutstäubchen, Blutfäden, Bakterien, Spirochäten, Amöben, Plasmodien, Blutplättchen, entweder im flüssigen oder im Trockenpräparat und benennt diese Art der Beobachtung „Untersuchung im künstlichen Dunkelfeld“.

Neben diesen allgemein anwendbaren Negativmethoden seien noch einige spezielle angeführt. *Yamamoto* hat gefunden, daß bei Silberimprägnation mit Reduktion Leprabacillen ungefärbt bleiben (ebenso einige andere Bakterienarten) als farblose Lücken auf braunschwarzem Grund, während Tuberkelbacillen, *Coli*, Friedländer, Pneumokokken, ältere Milzbrandbacillen schwarz erscheinen. Zur Spirochätendarstellung in Ausstrichen färbt *Kalb* mit Eosintriäzid, wobei sie sowohl als andere Bakterien ungefärbt bleiben sollen. *Lenartowicz* u. *Potrzebowski* behandeln Ausstriche mit Osmiumsäure, färben dann kurz mit Carbol-fuchsin; die Spirochaeta refringens sowie andere Bakterien färben sich dabei schwarzrot, die Pallida bleibt ungefärbt. Ihre Färbungsresistenz tritt nur nach Osmiumbehandlung zutage. Zur Kapseldarstellung färbt *Gins* mit Sublimat fixierte Tuscheausstriche mit Carbolthionin (5 bis 10 Minuten), *Rulison* sowie *Schiphorst* lufttrockene mit Carbol-fuchsin, *Hardouin* ebensolche mit Fuchsin oder Methylenblau. *Zettnow* hat bei einem Gallertbildner (*Micrococcus djokjakartensis*) eine differentielle Negativdarstellung erreicht, indem er nach Antimonbeizung schwach versilberte; die Beize wurde nur von der Gallerthülle gebunden, daher wurde diese geschwärzt, während in ihrem Innern die Kokken farblos blieben. Dementgegen bleiben die Kapseln bei der Silbermethode von *Yamamoto* ungeschwärzt, während die Bakterien schwarz erscheinen (bei Milzbrandbacillen, Pneumokokken, Friedländer). Für Tuberkelbacillen hat ferner *Baumgarten* eine differentielle Negativfärbung angegeben: das Trockenpräparat wird dabei mit schwacher Kalilauge vorbehandelt und mit verdünntem wässrigen Methylviolett gefärbt. Sputumbestandteile und andere Bakterien erscheinen blauviolett, die Tuberkelbacillen als ungefärbte Lücken. Ähnliche Erfahrungen machte *Eisenberg* mit anderen Farbstoffen (ohne Laugenvorbehandlung) nur lädierte Tuberkelbacillen können eventuell infolge Abnahme ihrer Färbungsresistenz gefärbt erscheinen. Analog ist die Negativdarstellung von Tuberkelbacillen in mit Berlinerblau gefärbten Schnitten nach *Solles*. *Benians* mischt Material zwecks Untersuchung auf Spirochäten mit Kongorotlösung, läßt die Ausstriche an der Luft trocknen und be-

handelt dann mit Salzsäurealkohol, wodurch die Spirochäten farblos auf blauschwarzem Grund erscheinen*.

Literatur.

Zusammengestellt bis inklusive 1920. Die Literatur der Kriegsjahre insbesondere die französische, englische und italienische zum Teil unvollständig infolge der Kriegsverhältnisse.

Zum I. Teil: Allgemeine Prinzipien der histologischen Färbung.

(Hier werden nur Werke und Artikel von übersichtlichem Inhalt angeführt.)

Bechhold H., Die Kolloide in Biologie und Medizin. S. 387—408. Steinkopff, Dresden 1912. — *Fischer A.*, Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. G. Fischer, Jena 1899. — *Freundlich H.*, Capillarchemie. Leipzig 1909. — *v. Georgievics G.*, Lehrbuch der Farbenchemie. 3. Aufl., Leipzig-Wien 1907; Lehrbuch der Gespinnstfasern. 2. Aufl., Leipzig-Wien 1908. — *Gierke H.*, Färberei zu mikroskopischen Zwecken. S. 185—219. Braunschweig 1885. — *Heidenhain M.*, Plasma und Zelle. I. Abt. 1. Lief. G. Fischer, Jena 1907; Artikel „Färbungen“ in der Enzyklopädie der mikrosk. Technik von Ehrlich u. Krause. 2. Aufl., I, S. 327 bis 349. Berlin 1910. — *Hueppe F.*, Die Methoden der Bakterienforschung. 5. Aufl., S. 61—190. Wiesbaden 1891. — *Lee A. B. u. Mayer P.*, Grundzüge der mikroskopischen Technik. Berlin 1907. — *Mann G.*, Physiological Histology. Oxford 1902. — *Michaelis L.*, Einführung in die Farbstoffchemie für Histologen. Berlin 1902; Artikel „Physikalische Chemie der Kolloide“ in „Physikalische Chemie und Medizin“ von Koranyi-Richter. II, S. 348—353. Leipzig 1908; Artikel „Färbung“ im Handbuch der Biochemie von Oppenheimer. G. Fischer, Jena 1911. — *Nietzki R.*, Chemie der organischen Farbstoffe. 4. Aufl., Berlin 1901. — *Pappenheim A.*, Grundriß der Farbchemie. Berlin 1901; Morphologische Hämatologie. Fol. haematol. 1917, XXII, S. 18—38. — *Pelet-Jolivet L.*, Die Theorie des Färbeprozesses. Steinkopff, Dresden 1910. — *Robertson T. B.*, Die physikalische Chemie der Proteine. S. 123—126. Steinkopff, Dresden 1912. — *Schultz G.*, Farbstofftabellen. 5. Aufl. (früher *Schultz-Julius*) Weidmann, Berlin 1918. — *Schwalbe C. G.*, Neuere Färbetheorien. Enke, Stuttgart 1907. — *Traube J.*, Über Oberflächenspannung und Flockung kolloider Systeme. Kolloidchem. Beih. 1912, III, S. 237 bis 336. — *Unna P. G. u. Golodetz L.*, Die Bedeutung des Sauerstoffs in der Färberei. Voss, Leipzig-Hamburg 1912. — *Witt O. N.*, Artikel „Färbung“ in der Enzyklopädie der mikrosk. Technik von Ehrlich u. Krause. 2. Aufl., I, S. 319—327. Berlin-Wien 1910. — *Zacharias P.*, Die Theorie der Färbvorgänge. Berlin 1908. — Außerdem viele Artikel in der Enzyklopädie der mikrosk. Technik von Ehrlich u. Krause. 2. Aufl., Schwarzenberg, Berlin-Wien 1910.

* Eine neue Beobachtungsmethode für Bakterien, insbesondere für Spirochäten, hat neuerdings *E. Hoffmann* (Berl. kl. Woch. 1921, Nr. 4 u. Nr. 7, D. med. Woch. 1921, Nr. 7, S. 203) (s. auch das betreffende Kapitel dieses Handbuchs) inaugurirt, das sog. „Leuchtbildverfahren“. Gefärbte Trockenpräparate werden dabei im Dunkelfeld untersucht; es treten dabei Bakterien, auch sonst schwach sich abhebende Spirochäten und Bakteriengeißeln, scharf leuchtend hervor. Siehe dazu auch *Dold H.*, D. med. Woch. 1921, Nr. 15, S. 413—414 und Zt. f. Imm.-Forsch. 1921, XXXVII, H. 2. *Keining E.* (M. med. Woch. 1921, Nr. 5 u. 15 und *Ficker M.* (D. med. Woch. 1921, Nr. 11, S. 286). Hierher wäre auch zu rechnen die „Fluoreszenzfärbung von Spirochäten im vital gefärbten Dunkelfeldpräparat“ (*Oelze*, M. med. Woch. 1920, Nr. 47). Reizserum wird mit gesättigter Chinablau-lösung vermischt und im Dunkelfeld untersucht.

Zum II. Teil: Allgemeine Grundlagen der Bakterienfärbung.

A. Zusammenfassende Darstellungen.

v. Baumgarten P., Lehrbuch der pathogenen Mikroorganismen. S. 180—208. Leipzig 1911. — Besson A., Technique microbiologique et sérothérapique. 6^e Ed. Paris 1914. — Cornil A. V. u. Babes V., Les bactéries. 2^e Ed., p. 72—86. Paris 1886. — Eisenberg Ph., Morphologische Veränderungen der Bakterien bei der Infektion und Immunität. Artikel im Handb. der Immunitätsforschung von Kraus u. Levaditi. 2. Aufl., II (erscheint demnächst). G. Fischer, Jena. — Grimme A., Zbl. f. Bakt. 1902, I. Abt., Orig. XXXII, S. 1, 81, 161, 241, 321. — Günther C., Einführung in das Studium der Bakteriologie. 4. Aufl., Leipzig 1906. — Heim L., Lehrbuch der Bakteriologie. 5. Aufl., Enke, Stuttgart 1918. — Kruse W., Allgemeine Mikrobiologie. S. 1—50. Leipzig 1910. — Lehmann K. B. u. Neumann R. O., Atlas und Grundriß der Bakteriologie. 5. Aufl., II. Teil, S. 681—708. Lehmann, München 1912. — Lipschütz B., Bakteriologischer Grundriß und Atlas der Geschlechtskrankheiten. Leipzig 1913. — Mayer A., Praktikum der botanischen Bakterienkunde. I. Teil. G. Fischer, Jena 1903; Die Zelle der Bakterien. G. Fischer, Jena 1912. — Mulzer P., Praktische Anleitung zur Syphilisdiagnose. 2. Aufl., Springer, Berlin 1912. — Nicolle M. u. Remlinger P., Traité de technique microbiologique. p. 301—339. Paris 1902. — Pfeiffer R. u. Friedberger E., Lehrbuch der Bakteriologie, II. G. Fischer, Jena 1918. — Unna P. G., Zbl. f. Bakt. 1888, III, S. 22, 61, 93, 120, 153, 189, 218, 254, 285, 312, 345; Histotechnik der leprösen Haut. Voss, Hamburg-Leipzig 1910.

Außerdem folgende Artikel im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kollé u. Wassermann. 2. Aufl., G. Fischer, Jena 1911/12:

Gottschlich E., Allgemeine Morphologie und Biologie der pathogenen Mikroorganismen. I, S. 37—86. — Friedberger E. u. Reiter H., Die allgemeinen Methoden der Bakteriologie. I, S. 321—386. — Sobernheim G., Milzbrand. III, S. 589—594. — Dieudonné A. u. Otto R., Pest. IV, S. 162—165. — Neisser M., Die Staphylokokken. IV, S. 356/57. — Neufeld F. u. Händel L., Pneumokokken. IV, S. 517/18. — Koch J., Gonorrhöe. IV, S. 663—670. — Schlegel M., Aktinomykose. V, S. 308/09. — Kossel H., Die Tuberkelbacillen. V, S. 395—404. — Jadassohn J., Lepra. V, S. 806—814. — Neisser M. u. Gins H. A., Diphtherie. V, S. 942—946. — Gins H. A., Bacillus fusiformis. V, S. 1005. — Wladimiroff A., Malleus. V, S. 1081 bis 1084. — Stein R. O., Ulcus molle. V, S. 1227. — Hutyra F., Septicaemia haemorrhagica. VI, S. 68/69. — Glage F., Die Eiterungen bei den Haustieren. VI, S. 154. — Bongert J., Die Drüse der Pferde. VI, S. 202/03. — Jensen C. O., Die vom Nekrosebacillus hervorgerufenen Krankheiten. VI, S. 248/49. — Abel R. u. Hallwachs W., Kapselbacillen. VI, S. 518/19. — Sobernheim G., Syphilisspirochäte. VII, S. 750—755. — Mühlens P., Rückfallspirochäte. VII, S. 869—872. — Scheller R., Artikel Diphtherie in Kollé-Wassermanns Handbuch. 1. Aufl.

B. Spezielle Arbeiten.

(Soweit hier Angaben fehlen sollten, suche man sie im Artikel von M. Ficker „Spezielles über Bakterienfärbung“ in diesem Handbuch.)

Agulhon H. u. Chavannes J., Compt. rend. soc. de biol. 1919, LXXXII, S. 149. — Albert R. u. W., Zbl. f. Bakt. II. Abt. 1901, VII, S. 737—742. — Alvarez u. Tavel, A. de Physiol. 1885, XVII, Nr. 7, S. 303. — Amato A., Zentralblatt für Bakteriologie, I. Abt., 1909, Orig. XLVIII, S. 385—393. — Appel L., Ebenda 1917, LXXX, S. 105—107. — Arens, Zentralblatt für Bakteriologie 1882, XI, S. 9. — Arima R. u. Sakamura Y., Ebenda. I. Abt. 1913, Orig. LXXII, S. 389—392. — Arloing F. u. Biot R., Bull. soc. d'Étude scient. sur la tub. 1913, II, Sér. III. — Armand-Delille et Lévy-Brühl, Ebenda. — Aronson H., Berl. klin. Woch. 1910, Nr. 35, S. 44; Ebenda 1898, Nr. 22; Ebenda 1912, Nr. 5, S. 204—207, Nr. 6, S. 251

bis 253, 277. — *d'Arrigo G.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., XXVIII, S. 481—485. — *Ascoli A.*, D. med. Woch. 1901, Nr. 20, S. 313. — *Auclair J. u. Paris L.*, A. de méd. exp. et d'anat. path. 1907, XIX, S. 129; 1908, XX, S. 737. — *Aujeszkzy*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., XXIII. — *Babes V.*, Virchows A. 1887, CV, S. 511—526. — *Bail O.*, Zentralblatt für Bakteriologie, I. Abt., 1908, Orig. XLVI, S. 488—502. — *Bail O. u. Rubritius H.*, Ebenda 1907, XLIII, S. 641—647. — *Barannikoff*, Zentralblatt für Bakteriologie, I. Abt., 1909, H. 2, Orig. L. — *Bartel u. Neumann*, Ebenda. XLVIII. — *Baumgarten*, Zt. f. wissenschaftl. Mikrosk. I, S. 51—60, 367—371; Zbl. f. med. Wiss. 1882, Nr. 25. — *Beauverie J.*, Compt. rend. soc. de biol. 1917, LXXX, S. 5. — *Beauverie u. Guilliermond A.*, Compt. rend. Ac. d. Sc. 1906, CXLII, S. 887—889. — *Beck*, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1918, XXXIX, H. 1. — *Benians T. H. C.*, J. of Path. and Bacter. 1912, XVII, S. 199—211; zit. bei *Noguchi H.*, J. exper. Med. 1918, XXVII, S. 667—678. — *Bergel S.*, Zt. f. Tuberk. 1914, XXI, S. 343; 1915, XXIII, S. 344; Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1918, XXXVIII. — *Berger*, Zbl. f. Bakt. 1910, I. Abt., Orig. LIII. — *Bergey D. H.*, Ges. amer. Bakt. Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1906, Ref. XXXVIII, S. 335. — *Bernstein E. u. Loewe L.*, J. of Infect. Dis. 1919, XXIV, S. 78. — *Bertarelli u. Volpino*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1905, Orig. XL; 1906, XLI. — *Besançon F. u. Philibert A.*, Bull. Soc. d'Et. scientif. sur la Tub. 1914, IV, II^e Ser., S. 32—38. — *v. Betegh L.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. XLIX, S. 461—463. — *Beyer A.*, Zt. f. Hyg. 1912, LXX, S. 225—272. — *Bienstock B.*, Fortschr. d. Med. 1886, IV, S. 193. — *Bierbaum*, Berl. Tierärztl. Woch. 1911, Nr. 15. — *Binger C. A. L.*, J. of Infect. Dis. 1919, XXV, S. 277. — *Bitter L.*, Virchows A. 1886, CVI; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXVIII, S. 227—238. — *Bittrolf u. Momose*, D. med. Woch. 1912, S. 16; Veröff. d. Robert Koch-Stiftg., H. 4. — *Boit E.*, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1916, XXXVI, S. 227. — *Boni J.*, D. A. f. klin. Med. 1901, LXIX, S. 542. — *Bordet J.*, Ann. de l'Inst. Past. 1895, IX, S. 462—506; 1896, X, S. 104—118; 1897, XI, S. 177 bis 213; M. med. Woch. 1900, Nr. 37. — *Borghesi A.*, Pathologica 1914, VI, S. 153. — *Borrel*, Bull. de l'Inst. Past. 1904, II, S. 409. — *Bostroem*, Verh. med. Ges. Giessen. Berl. klin. Woch. 1885; Zieglers Beitr. 1890, IX, H. 1. — *Botelho C.*, Compt. rend. Soc. de biol. 1918, LXXXI, S. 183. — *Bowhill*, Hyg. Rundschau 1898, VIII, S. 11, 105. — *Bozzelli R.*, Ann. d. Staz. sperim. per le mal infett. d. Bestiame 1914, II, S. 77—106. — *Braem*, Zieglers Beitr. 1889, VII, S. 1. — *Brandt R.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXXII, S. 1—22. — *Brereton G. E. u. Smitt K. W.*, Amer. J. med. Assoc. 1917, CXLVIII, S. 267. — *Brieger*, D. med. Woch. 1885, S. 810. — *Bronfenbrenner J.*, Proc. soc. exp. biol. and med. 1915, XII, S. 136. — *Browning C. H. u. Gilmour W.*, J. of path. and bacter. 1913, XVIII, S. 144/45. — *Brückner G.*, Zt. f. klin. Med. 1914, LXXX, S. 360. — *Brudny V.*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1908, XXI, S. 62—80. — *Buchner H.*, Ärztl. Intelligenzbl. 1884. — *Bujwid O.*, Przegląd chirurgiczny 1912. — *Bullock-MacLeod*, J. of Hyg. 1904, IV, S. 1. — *Bunge B. u. Trautenroth A.*, Fortschr. d. Med. 1896, XIV. — *Burchardt E.*, Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 1904, V, S. 706—708. — *Burckardt u. Enriquez*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1917, Orig. LXXX, S. 15—33. — *Bürger M.*, Biochem. Zt. 1916, LXXVIII, S. 155—164. — *Bürgers u. Schermann-Schreiber F.*, Zt. f. Hyg. 1912, LXX, S. 119—134. — *Burnet E.*, Ann. de l'Inst. Past. 1915, XXIX, S. 119. — *Buscalioni L. u. Rondelli A.*, Malpighia 1894, VIII, Ref. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1895, XII, S. 262. — *Caan A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. XLIX, S. 637—650. — *Camus-Pagniez*, Compt. rend. soc. de biol. 1905, LIX, S. 703. — *Cantacuzène J.*, Ann. de l'Inst. Past. 1905, XIX, S. 699. — *Carageorgiadès H.*, Compt. rend. soc. biol. 1918, LXXXI, S. 952, 1084. — *Carpano M.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXXI, S. 267—285; Ann. d'Ig. sperim. 1913, XXIII, S. 149 bis 160; Clinica veter. 1916; Ref. Bull. de l'Inst. Past. 1917, XV, S. 97. — *Carpintero A. G., Mayoral, Gamero y Lobo A. Ramón*, Rev. Valenc. de Cienc. med. 1914, XVI, S. 102; Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1915, Ref. LXIV, S. 46. — *Casares u. Gil*, Rev. de Sanidad mil. 1912 zit. bei *Galli-Valerio*. — *Cedercreutz A.*, A. f. Dermat. u. Syph. 1908, XCIII, H. 3. — *Cépède C.*, Compt. rend. Ac. Sc. 1918,

- CLXVI, S. 357. — *Cernovodeanu* u. *Henri V.*, Compt. rend. Ac. Sc. 1910, CL, S. 729—731. — *Cerrito*, Ann. d'Ig. sperim. 1903, XII, S. 288. — *Chaussé P.*, Ann. de l'Inst. Past. 1909, XXIII, S. 502. — *Churchman J. W.*, J. of exper. med. 1912, XVI, S. 221—247, 822—830; 1913, XVII, S. 373—378; 1913, XVIII, S. 187—188; Proc. of the soc. f. exper. biol. and med. 1914, XI, S. 54; Ref. Bull. Inst. Past. 1915, XIII, S. 139. — *Ciaccio C. V. u. Campari G.*, J. de Microg. 1887, XI, S. 154—155. — *Ciani H.*, Ann. Staz. per le mal. infett. d. Bestiame 1911—1913, I, S. 245—263; Ref. Bull. de l'Inst. Past. 1914, XII, S. 155. — *Ciechanowski S.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1903, Orig. XXXIII, H. 3. — *Claudius*, Ann. de l'Inst. Past. 1897, XI, S. 332. — *Claypole E.*, J. of exper. med. 1913, XVII, S. 99—116. — *Cohn E.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1903, Orig. XXXIII, S. 688—696. — *Collmann*, Dermat. Zt. 1916, XXIII, S. 321. — *Mc Conkey*, zeit. bei *Gemelli*. — *Conradi H. u. Troch P.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1912, Ref. LIV, Beiheft S. 63—65. — *Coppen-Jones*, Zbl. f. Bakt. 1895, XVII, S. 1, 70. — *Corper S. H.*, J. of Infect. Dis. 1913, XII, F. 2. — *Crabtree E. G.*, Ebenda 1914, XV, S. 309. — *Czaplewski E.*, Hygienische Rundschau 1896, VI, Nr. 21, S. 1029—1037; Untersuchung des Auswurfs auf Tuberkelbacillen. G. Fischer, Jena 1891. — *Dangeard*, Bull. Soc. Mycol. de France 1916, XXXII; Ref. Bull. de l'Inst. Past. 1917, XV, S. 198. — *Davidsohn C.*, Berl. kl. Woch. 1905. — *Dębiński B.*, Dyagnostyka gruźlicy. Wende, Warszawa 1912. — *Delbanco*, Monatsh. f. prakt. Dermat. 1905, XLI, S. 363. — *Deussen*, Zt. f. Hyg. 1918, LXXXV, S. 235 bis 322. — *Deutsch L.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1903, Orig. XXXIII, S. 214—229. — *Deycke A.*, M. med. Woch. 1910, S. 633; *Deycke A. u. Much H.*, Berl. kl. Woch. 1910, Nr. 42, S. 1933—1935. — *Dietrich A.*, Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 1908, XIX, S. 3—6; *Dietrich A. u. Liebermeister*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1902, Orig. XXXII, S. 858. — *Dohi u. Tanaka*, Jap. Zt. f. Dermat. 1906, I. — *Dold H.*, Arb. a. d. kais. Ges.-Amt 1911, XXXVI, S. 433—445. — *Dorset M. u. Emery*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1906, Ref. XXXVII, S. 363. — *Dostal H.*, Frankf. Zt. f. Path. 1916, XIX, S. 198—205. — *Dostal H. u. Ender F.*, Wr. kl. Woch. 1913, Nr. 27. — *Dreyer G.*, *Kriegler C. u. Walker E. W. A.*, J. of Path. and Bact. 1911, XV, S. 134. — *Duckwall E. W.*, 6. Vers. amer. Bakt. Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1906, Ref. XXXVII, S. 360. — *Eber A.*, Erg. d. allg. Path. u. path. Anat. v. *Lubarsch-Ostertag* 1917, XVIII, H. 2, S. 1—371. — *Ehrlich P.*, Charité-Annalen 1886, XI, S. 123; D. med. Woch. 1882, Nr. 19, S. 269; 1883, S. 159. — *Ehrlichówna P.*, Gazeta lekarska 1910, Nr. 13. — *Eisenberg Ph.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Orig. XLVII, S. 415—427; 1908, XLVIII, S. 257—274; 1909, XLIX, S. 465—492; 1909, LI, S. 115—121; 1910, LIII, S. 481—485, 551—552; 1910, LVI, S. 183—186, 193—201; 1913, LXXI, S. 420—503; 1918, LXXXI, S. 72 bis 104; 1918, LXXXII, S. 69—208; St. Petersburger med. Woch. 1909, Nr. 8; Berl. kl. Woch. 1910, Nr. 8; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1912, Ref. LIV, Beih. S. 145—153; D. med. Woch. 1918, Nr. 39. — *Emmerich R. u. Saïda*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1900, Orig. XXVII, S. 776—787. — *Epstein*, J. of Infect. Dis. 1906, III, S. 770. — *Ernst P.*, Zt. f. Hyg. 1888, V; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1894, XVI, S. 182. — *van Ermenghem*, Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1894, XV. — *Esch D.*, Zt. f. Hyg. 1914, LXXVII, S. 389—435. — *Falières*, Diss. Fac. de méd. Paris 1902. — *Faticchi G.*, Lo Sperimentale 1886, Sett., Ref. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1886, III, S. 537. — *Feinberg*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1900, XXVII, S. 417. — *Feser A.*, Zentralblatt für Bakteriologie, I. Abt., 1912, Orig. LXVI, S. 137—142. — *Ficker M.*, Archiv für Hygiene, XLVI, S. 171. — *Fischer A.*, Vorlesungen über Bakterien. 2. Aufl., G. Fischer, Jena 1903, S. 25; Zentralblatt für Bakteriologie, I. Abt., 1912, Orig. LXV, S. 586—589. — *Fischer H.*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1912, XXIX, S. 63—66. — *Fitschen E.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1917, Orig. LXXX, S. 29—33. — *Flügge C.*, Zt. f. Hyg. 1894, XVII; 1897, XXV; 1899, XXX; 1901, XXXVIII. — *Fontana u. Tribondeau*, zit. bei *Besson*. — *Fontes A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. XLIX, S. 317, 321; Mem. do Inst. Oswaldo Cruz 1914, VI, F. 3, S. 221—223. — *Foth*, Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde 1910, XXXVI, S. 95. — *Fraenkel A.*, Berliner klinische Wochenschrift 1898, Nr. 40, S. 880. — *Fraenkel B.*, Ebenda 1884, Nr. 13. — *Fraenkel C. u. Pfeiffer R.*,

Mikrophotographischer Atlas der Bakterien. 2. Auflage. — *Frei W.* u. *Pokschischewski N.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LX, S. 161—167. — *Frosch u. Kolle* in *Flügges Mikroorganismen* 1896, II. — *Frosch P.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1912, Orig. LXIV, S. 118—120. — *Fursenko B.*, Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 1911, XXII, S. 97, 101. — *Fürst*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1910, Orig. LVI, S. 97—110. — *Fütterer G.*, Virchows A. 1885, CI, S. 198. — *Gabbet*, Lancet 1887, S. 757. — *Gabritschewsky G.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1902, Orig. XXXI, S. 813—816. — *Gair G.*, The Veter. Record. 1914, Ref. Bull. de l'Inst. Past. 1914, XII, S. 495. — *Galalescu P.*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1906, XXIII, S. 67—69. — *Galli-Valerio B.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1917, Orig. LXXIX, S. 233—234; LXXX, S. 264—271. — *Gasis D.*, Ebenda 1909, L, H. 1, S. 111 bis 128; Berl. kl. Woch. 1909, Nr. 18; 1910, Nr. 31. — *Gassner G.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1918, Orig. LXXXI, S. 477—492. — *Gauducheau A.*, Bull. soc. med. chir. de l'Indochine 1916, VII, Ref. Bull. de l'Inst. Past. 1917, XV, S. 99. — *Gauß*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1902, Orig. XXXI, S. 92. — *Geipel P.*, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1910, XVII, S. 51—67; M. med. Woch. 1909, S. 1154. — *Gemelli E.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1903, Orig. XXXIII, S. 316—318. — *Gheorghiewsky*, Ann. de l'Inst. Past. 1899, XIII, S. 308. — *de Giacomi*, Korrespbl. f. Schw. Ärzte 1885, Nr. 12. — *Gibbes H.*, Lancet 1883, S. 771. — *Gins H. A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. LII, H. 5; 1911, LVII, H. 5. — *Glück A.*, Wr. kl. Woch. 1917, Nr. 3, S. 71—72. — *Goldhorn*, Proc. of the New York Pathol. Soc. 1905, V, zit. bei *Sobernheim*. — *Gottberg*, A. f. Hyg. 1908, LXV. — *Gottstein A.*, D. med. Woch. 1886, Nr. 42, S. 737; Fortschr. d. Med. 1885, III, S. 627; 1886, IV, S. 225. — *Gram C.*, Fortschr. d. Med. 1884, II, Nr. 6, S. 185. — *Gramsche Färbung*, Artikel in Enzykl. d. mikr. Technik. 2. Aufl., 1910, I, S. 502. — *Griesbach H.*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1888, V, S. 314—319. — *Grigorjew* (zit. bei *Grimme*), Russkaja Medicina 1886, Nr. 42—43. — *Grosso G.*, Fol. haematol. 1914, XVIII, S. 71—76; Pathologica 1914, VI, S. 235; 1918, X, S. 163 bis 165. — *Guerbet, Mayer, Schaeffer*, Compt. rend. soc. de biol. 1910, LXVIII, S. 353—356. — *Guilliermond A.*, A. f. Protistenkunde 1910, XIX, S. 289; Compt. rend. soc. biol. 1916, LXXIX, S. 1090. — *Guilliermond A. u. Marras*, Ebenda 1908, LXIV, S. 307. — *Günther C.*, D. med. Woch. 1887, Nr. 22. — *Gyenes E. u. Sternberg F.*, Berl. kl. Woch. 1913, S. 2282. — *Hadley Ph. B. u. Bryland R., Elkins M.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1914, Orig. LXXII, S. 478—480. — *Hall J. C. u. Taber L. B.*, J. Infect. Dis. 1914, XV, S. 566. — *Hammerschlag*, Zentralblatt für innere Medizin 1910, S. 9. — *Harrison F. C.*, Zentralblatt für Bakteriologie, I. Abt., 1907, Ref. XL, S. 352. — *Hatano*, Berl. kl. Woch. 1909, Nr. 37. — *Hausmann Th.*, Berl. kl. Woch. 1913, Nr. 22, S. 1021. — *Heidenhain M.*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1903, XX, S. 179—186. — *Heim L.*, A. f. Hyg. 1901, XL; M. med. Woch. 1904. — *Helbing C.*, D. med. Woch. 1900, S. 133. — *Henneberg W.*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1916, XV, S. 50 bis 62. — *Henrici A. T.*, J. of Med. Res. 1914, XXX, S. 409. — *Herman*, Ann. de l'Inst. Past. 1889, IV, Nr. 3; 1908, XXIII, S. 92. — *van Herwerden*, Fol. microbiol. 1917, V, S. 1—12. — *Herzheimer G. u. Huber*, D. med. Woch. 1905. — *Hessert W.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1894, XVI, S. 346. — *Heydenreich L. L.*, Russk. Wratsch. 1887, Nr. 33, S. 632; Ref. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1888, V, S. 397—398. — *v. Hibler*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1896, XIX, S. 33, 113. — *Hieroclès C.*, A. f. Hyg. XXVIII, S. 163—183. — *Hijmans van den Berg A.*, Zentralblatt für Bakteriologie, I. Abt., 1896, XX, S. 785—792. — *Hinterberger A.*, Ebenda, XXX, S. 417—424. — *Hoffmann A.* (Halle), Münch. mediz. Wochenschrift 1906, Nr. 31, S. 1516. — *Hollande A. Ch.*, Compt. rend. soc. de biol. 1916, LXXIX, S. 746; 1917, LXXX, S. 7, 529, 676. — *Holtzendorff*, Berl. tierärztl. Woch. 1894. — *Homburger E.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1900, XXVII, S. 533. — *Honsell*, Arb. a. d. Geb. d. path. Anat. von *Baumgarten* 1896, II. — *Hontoon F. M.*, J. of Bact. 1917, II, S. 241—243. — *Hornicker E.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1902, Orig. XXXII, S. 926. — *Hottinger R.*, Ebenda 1915, LXXVI, S. 367—384. — *Huntoon F. M.*, J. Amer. Med. Assoc. 1914, S. 1397; Ref. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1916, XXXIII, S. 82; A. f. Dermat. u. Syph. 1915, CXXII, S. 351. — *Ilkewicz*, Zbl. f. Bakt. XV, S. 261—267. — *Ishiwara T.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913,

- Orig. LXVIII, S. 113—117. — *Israel O.*, Virchows A. 1886, CV, S. 169. — *Jacobitz*, Berl. kl. Woch. 1917, S. 138. — *Jacobsthal*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Ref. LVII, Beih. S. 98. — *Jadassohn*, Artikel Gonorrhöe im Handb. d. Geschlechtskrankheiten. I, Wien-Leipzig 1910. — *Jansen A. M.*, J. of Infect. Dis. 1914, XIV, S. 255. — *Jarotzky*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1904, Ref. XXXVI, S. 473—475; 1907, Orig. XLIV, S. 76—89. — *Jensen V.*, Berl. kl. Woch. 1912, Nr. 35, S. 1663—1665. — *Jobling S. W.* u. *Petersen W.*, J. of exper. med. 1914, XX, S. 321, 452; Zt. f. Immunitätsforsch. 1915, Orig. XXIV, S. 292. — *Jonesco u. Mihaesti*, Compt. rend. Soc. de biol. 1918, LXXXI, S. 1088—1090. — *Kantorowicz*, M. med. Woch. 1909, Nr. 18, S. 897—900. — *Kayser H.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1912, Orig. LXII, S. 174 bis 176. — *Keins M.*, A. f. Hyg. 1914, LXXXII, S. 111—148. — *Kent A.*, Lancet. 1910, CLXXXVIII, Nr. 4526, S. 1473. — *Kern F.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1897, XXII. — *Kindborg E.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1918, Orig. LXXX, S. 188—190. — *Kirchensstein A.*, Tuberkulosis 1914, XIII, S. 121; Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1914, XXXI, S. 33—69. — *Kischensky D.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1897, XXI, S. 876—877. — *Kisskalt C.*, Ebenda 1901, XXX, S. 281—284. — *Klausner E.*, Berliner klinische Wochenschrift 1913, Nr. 7, S. 310. — *Klebs G.*, Zentralbl. f. Bakteriologie, I. Abt., 1896, XX, S. 499. — *Klein E.*, Ebenda 1892, XII, S. 905; 1900, XXVIII, S. 113. — *Klemperer G.*, D. med. Woch. 1885, Nr. 47, S. 809. — *Kligler J.*, J. of exper. med. 1913, XVII, S. 653. — *Knaak*, Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., XXIII, S. 343. — *Knack A. V.*, Ebenda 1915, Orig. LXXVI, S. 235—236. — *Knoll*, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1910, XV, S. 211; 1910, XVII, S. 65. — *Koch R.*, Cohns Beitr. z. Biol. d. Pflanzen 1877, II; Untersuchungen über die Ätiologie der Wundinfektionskrankheiten. Leipzig 1878; Mitt. a. d. kais. Ges.-Amt 1884, II; D. med. Woch. 1891, S. 1189; 1897, S. 209. — *Kondo S. u. Oguni H.*, J. Centr. Veter. Med. Assoc. (Jap.), XXX, Nr. 12; Ref. Bull. Inst. Past. 1918, XVI, S. 593. — *Koźniewski T.*, Przegląd lekarski 1913, Nr. 51. — *Kral F.*, Versammlung der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte. Karlsbad 1903, II, S. 621. — *Kraus R. u. Hofer G.*, Deutsche medizinische Wochenschrift 1912, Nr. 26; Zentralblatt für Bakteriologie, I. Abt., 1912, Ref. LIV, Beih. S. 191—200. — *Krefting*, Archiv für Dermat. u. Syph. 1892, Suppl. II, S. 41. — *Kresling*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1901, XXX, S. 897. — *Krompecher E.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1901, XXX, S. 384, 425. — *Kronberger H.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXXI, S. 240—254; Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1910, XVI, H. 2. — *Krumwiede Ch. u. Pratt J. S.*, J. of exper. med. 1914, XIX, S. 20—27, 50. — *Krumwiede Ch. u. Fielder F. S.*, *Watson Th. A.*, J. of Infect. Dis. 1918, XXII, S. 118. — *Kruse W.*, M. med. Woch. 1910, Nr. 13; Allgem. Mikrobiologie, S. 40—44, Leipzig 1910. — *Kruse W.*, *Bürgers u. Hösch*, Zt. f. Hyg. — *Krylow D. O.*, Zt. f. Hyg. 1911, LXX, S. 135—148. — *Kühne H.*, Zbl. f. Bakt. 1890, VIII, S. 293; Zt. f. Hyg. 1886, I, S. 553; Praktische Anleitung zum mikroskopischen Nachweis der Bakterien im tierischen Gewebe. Günther, Leipzig 1888. — *Kühnemann G.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1911, Orig. LVII, S. 497—499. — *Kütke H.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1915, Orig. LXXXVI, S. 409—434. — *Lagerberg J.*, Ebenda 1917, LXXIX, S. 191 bis 192. — *Lancereaux E.*, Presse méd. 1919, S. 565. — *Landau*, Berliner klinische Wochenschrift 1916, S. 717. — *Lange C. u. Nitsche P.*, Deutsche medizinische Wochenschrift 1909, Nr. 10; Zeitschrift für Hygiene 1910, LXVII, S. 151—158. — *Langer*, Berl. kl. Woch. 1916, S. 850; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1916, Orig. LXXXVIII, S. 117; *Langer u. Krüger*, D. med. Woch. 1916, Nr. 24, S. 722. — *Lanz A.*, D. med. Woch. 1898, Nr. 40, S. 637. — *Lenartowicz J. J. u. Potrzebowski K.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1910, Orig. LVI, S. 186—191. — *Lenhartz*, M. med. Woch. 1897, Nr. 47. — *Lenhoff K.*, Med. Klin. 1910, Nr. 28, S. 1105—1106. — *Lesieur Ch. u. Jacquet P.*, Compt. rend. Soc. de biol. 1919, LXXXII, S. 267; *Lesieur Ch. u. Jacquet P.*, *Pinetnet*, Ebenda, S. 251. — *Léon N.*, Zool. Anz. 1888, XI, S. 624. — *Lespinasse M.*, Compt. rend. Acad. Sc. 1918, CLXVII, S. 702—704. — *v. Leszczynski R.*, A. f. Dermat. u. Syph. 1904, LXXI, S. 409. — *Levaditi C.*, Ann. Inst. Past. 1906, XXI. — *Levaditi u. Maroucliau*, Compt. rend. Soc. de biol. 1906, LIX, S. 25. — *Lévy P. P.*

- u. de Léobardy J., Compt. rend. Soc. de biol. 1918, LXXXI, S. 106. — Lewis P. A., J. of exper. med. 1917, XXV, S. 441. — Lichtweiß F., Zt. f. Tuberk. 1916, XXV, S. 108. — v. Lingelsheim, Ätiologie und Therapie der Staphylokokkeninfektionen. Schwarzenberg, Berlin-Wien 1900. — Lipp H., M. med. Woch. 1917, Nr. 41, S. 1349 bis 1350. — Ljubinsky, Zbl. f. Bakt. 1895, XVIII, S. 125. — Löffler F., D. med. Woch. 1906, Nr. 31, S. 1243—1244; 1907, S. 169. — Löwe S., Biochem. Zt. 1912, XLII, S. 150—218. — Löwit M., Sitzungsbericht der Akademie der Wissenschaften in Wien. Math.-naturwissenschaftl. Klasse 1904, CXIII, Abt. III. — London S., Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., XXV, S. 839. — Lübbert, Biologische Spaltpilzuntersuchungen. Würzburg 1886. — Lüdimoff, Zbl. f. Bakt. 1888, III, S. 540. — Lucciarini T., Ann. dell'Ist. Maragliano 1915, VIII, S. 33; Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1916, Ref. LXV, S. 347. — Lüpke, D. tierärztl. Woch. 1895. — Luska F., A. f. Protistenk. 1914, XXXIII, S. 272—312. — Lustgarten, Wr. med. Jahrb. 1885: Ref. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1885, II, S. 408—410. — Lutz, Dermat. Studien, H. 1, S. 404, Voß, Hamburg 1886. — Maffucci, Zt. f. Hyg. 1892, XI, S. 445. — Magrou E., Thèse Fac. med. Paris 1914; Ref. Bull. Inst. Past. 1915, XIII, S. 74—76. — Manchan T. J., Boston Med. and Surg. J. 1906, CLIV, Nr. 10, S. 264—266. — Marassini A., Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXXI, S. 113—128. — Marinesco G., Compt. rend. Soc. de biol. 1919, LXXXII, S. 258. — Marmann, A. f. Hyg. 1912, LXXVI, S. 245—255. — Marmorek, Berl. kl. Woch. 1907. — Harpmann G., Die Spaltpilze. Halle 1884. Ref. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1884, I, S. 117—119. — Marx H. u. Wöithe F., Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1900, XXVIII, S. 1, 33, 65, 97. — Marzinowsky, Ebenda 1899, S. 762. — Matterstock G. K., Mitt. a. d. med. Klin. Würzburg. Bergmann, Wiesbaden 1886: Ref. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1886, III, S. 107—109. — Meader Ch. N., Amer. J. of med. Sc. 1915, CL, S. 858; Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1918, Ref. LXVII, S. 18. — Meillere G., J. de Pharm. et Chim. (7), 1914, IX, S. 23—24; Ref. Bull. Inst. Past. 1914, XII, S. 495. — Meirousky E., Studien über die Fortpflanzung von Bakterien, Spirillen und Spirochäten. Springer, Berlin 1914. — Meisenheimer J., Zt. f. physiol. Chem. 1903, XXXVII, S. 518—526. — Mesnil F., Ann. de l'Inst. Past. 1895, IX, S. 301—351. — Metalnikow S. J., Zt. f. Immunitätsforsch. 1914, Orig. XXII, H. 3, S. 235—254. — Metchnikoff E., Ann. de l'Inst. Past. 1894, VIII, S. 58—64; Virchows A. 1888, CXIII, S. 63. — Michaélides, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1907, VIII, S. 79. — Michaélis L., Zbl. f. Bakt. I. Abt., XXIX, S. 768; Pflügers A. 1903, CLII, S. 634 bis 640. — Miller A. H., J. of Path. and Bact. 1917, XXI, S. 41. — Mills, zit. nach Baumgartens Jahresber. 1892, VIII, S. 67. — Minder L., Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1915, Orig. LXXVII, S. 113—130. — Minervini R., Zt. f. Hyg. 1898, XXIX, S. 117—147. — Mircoli, zit. bei Borghesi. — Möller, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1891, X. — Morel u. Dulaus, zit. bei Besson. — Much H., Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1907, VIII, S. 1885. — Muir R., J. of Path. and Bact. 1916, XX, S. 257. — Müller A., Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1901, XXIX, S. 791. — Münzberg P., D. med. Woch. 1917, Nr. 34, S. 1069 bis 1070. — Nastiukow u. Pewsner, Zbl. f. Bakt. 1893, XIV, S. 816. — Neelsen, Zbl. f. med. Wiss. 1883, S. 600. — Neide E., Ebenda 1904, Orig. XXXV, S. 508 bis 521. — Neisser M., Zt. f. Hyg. 1897, XXIV, S. 443. — Nicolas, Favre u. André, Lyon médical 1905, zit. bei Friedberger u. Reiter. — Nicolle M., Ann. de l'Inst. Past. 1895, IX. — Nicolle u. Alilaire, Ebenda 1909, XXIII, S. 556. — Nikitine, A. russ. de Pathol. 1908, VI, S. 132—143, 162—163. — Nocht, Zentralblatt für Bakteriologie, I. Abt., 1898, XXIV; 1899, XXV. — Nötzl, Fortschritte der Medizin 1896. — Nowak J., Sprawozdanie X Zjazdu lek. i przyr. polsk. we Lwowie 1907 (poln.). — Nyfeldt A., Nord. med. Arkiv L Afd. 2. H. 1/2, Nr. 6; Ref. in Schmidts Jahrb. 1918, CCCXXVIII, S. 1. 15. — Ogawa M., Mitt. d. Med. Ges. Tokio 1903, XVII, Nr. 22; Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1905, Ref. XXXVI, S. 606. — Ohlmacher, Med. News 16. Febr. 1895; Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1895, XVIII, S. 214. — Okolska M., laut privater Mitteilung an den Ref. — Ölze W. F., Zt. f. wiss. Mikrosk. 1914, XXXI, S. 43—50; A. z. mikrosk. Anat. I. Abt., 1914, LXXXIV, S. 91 bis 121. — Ország, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1906, Orig. XLI, H. 3. — Ottolenghi D.,

- Zt. f. Immunitätsforsch. 1911, Orig. IX, S. 769—779; 1912, XII, S. 386—400. — *Paltauf R.*, Wr. kl. Woch. 1891. — *Pappenheim A.*, Berl. kl. Woch. 1898, S. 809; *Monatsh. f. prakt. Dermat.*, XXXVI, S. 361; *Verh. d. Naturwiss. Ver. Hamburg* 1902, III. F., X, S. 28—29; *Ref. Zbl. f. Bakt. II. Abt.*, 1902, IX, S. 344; *Folia haemat.* 1917, XXII, S. 15—16. — *Peters H.*, Die Untersuchung des Auswurfs auf Tuberkelbacillen. Wigand, Leipzig 1886. — *Petroff S. A.*, Zt. f. Tuberk. 1915, XXIV, S. 262; *J. of exper. med.* 1915, XXI, S. 38. — *Pfeiffer P. u. Modelski*, Zt. f. physiol. Chem. 1912, LXXXI, S. 331; 1913, LXXXV, S. 1. — *Pfeiffer P. u. Wittka F.*, Chemiker-Ztg. 1916, XL, S. 357. — *Pfeiffer R.*, laut privater Mitteilung an den Ref. — *Pianese*, Baumgartens Jahresber. 1892, VIII. — *Pick L. u. Jacobsohn J.*, Berliner klinische Wochenschrift 1896, Nr. 36, S. 811—812. — *Piorkowski*, Zentralblatt für Bakteriologie, I. Abt., 1901, XXIX. — *Plato J.*, Berliner klinische Wochenschrift 1899, Nr. 49, S. 1085. — *Plaut H.*, Färbungsmethoden zum Nachweis der fäulniseregenden und pathogenen Mikroorganismen. 2. Aufl., Voit, Leipzig 1885. — *Ponder Constant*, *Lancet* 1912, II, S. 22. — *Porges H.*, *Ges. d. Ärzte in Wien*, 23. Juni 1916; *Ref. M. med. Woch.* 1916, Nr. 32, S. 1164. — *Preis H.*, *Budapester Ärztevereinigung*, 23. Okt. 1912, zit. bei *Eber.* — *Prior*, Berl. kl. Woch. 1883, S. 498. — *Proca G.*, *Compt. rend. Soc. de biol.* 1909, LXVII, Nr. 25, S. 148. — *Proca G. u. Danilo P.*, *Ebenda* 1909, Nr. 27, S. 307. — *Proca G. u. Vasilescu*, *Revista stintelor medicale*. Juni 1905, zit. bei *Friedberger u. Reiter.* — *Przesmycki A. M.*, *Compt. rend. Soc. de biol.* 1915, LXXXVIII, S. 63; *Biologisches Zentralblatt* 1894, XIV, S. 620—626. — *Quensel U.*, *Upsala Läkare förenings Föreläsningar* 1918, Ny Fjöld XXIII, H. 5—6, S. 384—386. — *Räbiger*, *Zeitschrift für Fleisch- und Milhygiene* 1901; *Berl. tierärztl. Woch.* 1907. — *Radziewsky A.*, *Zt. f. Hyg.* 1900, XXXIV, S. 369—464; 1901, XXXVII, S. 13; *Zbl. f. Bakt. I. Abt.*, 1899, XXVI, S. 753—757. — *Raskin M.*, *D. med. Woch.* 1911, Nr. 51. — *Ravant u. Ponselle*, *Compt. rend. Soc. de biol.* 1908, LXV. — *Reichenow E.*, *Arb. a. d. kais. Ges.-Amt* 1909, XXXIII, S. 1—45. — *Reichert F.*, *Beiträge zur Gramfärbung*. Diss. Heidelberg 1913. — *Reitmann*, *Deutsche medizinische Wochenschrift* 1905. — *Remy u. Sugg*, zit. bei *Besson.* — *Renaux E. u. Wilmaers A.*, *Compt. rend. Soc. de biol.* 1917, LXXX, S. 55. — *Rindfleisch*, *Sitzungsbericht der phys.-medizinischen Ges. Würzburg* 1882. Nr. 8; *Ref. Zt. f. wiss. Mikrosk.* 1884, I, S. 293. — *Rist E., Léon N., Kindberg M. u. Rolland J.*, *Ann. de Med.* 1915, I, S. 310—375; *Ref. Bull. Inst. Past.* 1916, XIV, S. 162—164. — *Ritchie*, *J. of Path. and Bact.* 1905, X, S. 334. — *Rocheix u. Colin*, zit. bei *Weil.* — *Romanowsky*, *Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria*. Petersburg 1891. — *Rondelli u. Buscalioni*, *Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt.*, 1887, XXI, S. 70. — *Rosam A.*, *Zbl. f. Bakt. II. Abt.*, 1908, XX, S. 724. — *Rosenblatt S.*, *Zbl. f. Bakt. I. Abt.*, 1911. Orig. LVIII. — *Rosenthal W.*, *M. med. Woch.* 1918, Nr. 46, S. 1282—1284. — *de Rossi G.*, *Zbl. f. Bakt. I. Abt.*, 1903, Orig. XXXIII, S. 572—576. — *Rottky K.*, *Ebenda* 1914, LXXIV, S. 285—293. — *Roux u. Borrel*, *Ann. Inst. Past.* 1898, XII, S. 225. — *Ruppel*, *Zt. f. phys. Chem.* 1898, XXVI, S. 218. — *Russelt D. G.*, *J. of exper. med.* 1914, XX, S. 545—555. — *Ruzicka V.*, *Archiv für Hygiene*, XLVII, S. 337—389; LI, S. 281—318; *Pflügers A.* 1905, CVII, S. 497—534; *Archiv für Protistenkunde* 1910, X, S. 247—305; *Zbl. f. Bakt. II. Abt.*, 1909, XXIII, S. 292; 1913, XXXVI, S. 577—587. — *Saathof*, *D. med. Woch.* 1905, Nr. 51. — *Sabrazès*, *Ann. de l'Inst. Past.* 1903, XVII, S. 303. — *Sahli H.*, *Zt. f. wiss. Mikrosk.* 1885, II, S. 49—51. — *Salimbeni*, *Ann. de l'Inst. Past.* 1898, XII, S. 192—209. — *Sata A.*, *Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat.* 1900, XI, S. 97—102. — *Sayé L.*, *Treballs de la Soc. de biol.* S. 147, *Barcelona* 1914; *Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt.*, 1918, *Ref. LXVI*, S. 198. — *Schäffer J.*, 5. Kongr. d. Dermat. Ges. in Graz 1895, zit. bei *Koch.* — *Schallert R.*, *Zt. f. Hyg.* 1914, LXXVII, S. 371—388. — *Schauffler W. G.*, *Med. Record* 1902, S. 909; *Allgem. med. Zentralztg.* 1902, Nr. 70. — *Schepotieff A.*, *Zool. Jahrb.* 1912, XXXIV, S. 57—96. — *Schereschewsky*, *Zbl. f. Bakt. I. Abt.*, 1907. Orig. XLV. — *Schippphorst*, *Zbl. f. Bakt. I. Abt.*, 1918, Orig. LXXXI, S. 293. — *Schlegel M.*, *Berl. tierärztl. Woch.* 1903, Nr. 26. — *Schmidt A.*,

- Wr. kl. Woch. 1892, S. 643. — *Schmitz H.*, Berl. kl. Woch. 1917, Nr. 6; 1918, Nr. 13. — *Schneider H.*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1914, XXXI, S. 51—69. — *Schrön H.*, zit. bei *d'Arrigo*. — *Schulemann W.*, A. d. Pharm. 1912, CCL, S. 252—279; Zt. f. exper. Path. u. Ther., XVII, H. 3. — *Schumburg W.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1902, Orig. XXXI, S. 624. — *Schürmann W.* u. *Pringsheim E.*, Med. Klin. 1915, Nr. 42, S. 1158—1159. — *Semenowicz W.* u. *Marzinowsky E.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1897, XXI, S. 874—876. — *Sherman H.*, J. of Infect. Dis. 1913, XII, H. 2, S. 249. — *Shimidsu K.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXXI, S. 338—342. — *Shmamine J.*, Ebenda 1911, LXI, S. 410. — *Simon u. Wood*, J. Amer. Med. Assoc. 1914, CXLVII, S. 247. — *Simoninia*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1914, Orig. LXXIV, S. 343—348; 1915, LXXV, S. 398—407. — *Smith L. D.*, J. Amer. Med. Assoc. 1914, S. 1251; A. f. Dermat. u. Syph. 1915, CXXII, S. 351. — *Smith J. B.*, Brit. Med. J. 1901, Nr. 2091, S. 205—206. — *Smyth H. F.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXXI, S. 319—322. — *Snyder W. H.*, A. f. Ophthalm. 1912, XLI, S. 599; Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., Ref. LVIII, S. 271—272. — *Sommerfeld*, D. med. Woch. 1910, Nr. 11. — *de Souza A.*, Compt. rend. Soc. de biol. 1887, IV, S. 622. — *Spehl P.*, Compt. rend. Soc. de biol. 1918, LXXX, S. 248; 1918, LXXXI, S. 305. — *Spengler C.*, Deutsche medizinische Wochenschrift 1907, S. 337; Zeitschrift für Hygiene 1905, XLIX, S. 541. — *Stach Z.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1918, Orig. LXXXI, S. 476—477. — *Stahr H.*, M. med. Woch. 1916, S. 1041. — *Stephan R.*, M. med. Woch. 1917, Nr. 8; Feldärztl. Beil., S. 257—260; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. LI, S. 94—96. — *Stern R.*, D. med. Woch. 1907; Berl. kl. Woch. 1907. — *Stévenel L.*, Bull. Soc. path. exot. 1918, XI, S. 870; Ref. Bull. Inst. Past. 1919, XVII, S. 27. — *Stewart F. C.*, J. of exper. med. 1917, XXVI, S. 755. — *Suzuki S.*, Zeitschrift für Immunitätsforschung 1911, Orig. X, S. 515 bis 535; A. f. Hyg. 1911, LXXIV, S. 345—378. — *Szuman*, Nowiny lekarskie 1890, S. 581—589 (poln.). — *Tamura S.*, Zt. f. physiol. Chem. 1914, LXXXVII, S. 85—115; LXXXIX, S. 289—303; XC, S. 286—290. — *Tarchetti C.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1904, Orig. XXXV, S. 410. — *Teague O.* u. *Buxton B. H.*, Zt. f. phys. Chem., LXII, S. 304 bis 306. — *Telemann W.*, D. med. Woch. 1910, Nr. 19. — *Thesing*, A. f. Hyg., L. — *Thost*, D. med. Woch. 1886, Nr. 10, S. 161. — *Thurn O.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1914, Orig. LXXIV, S. 81—90. — *Treuholtz*, Med. Record 1908, LXXIII. — *Tribondeau L.*, Compt. rend. Soc. de biol. 1916, LXXIX, S. 1022; 1917, LXXX, S. 880; 1918, LXXXI, S. 594, 639, 641. — *Tribondeau L.* u. *Dubreuil J.*, Ebenda 1917, LXXX, S. 331; Compt. rend. Ac. Sc. 1917, CLXIV, S. 551—553. — *Tribondeau L.*, *Fichet M.* u. *Dubreuil J.*, Compt. rend. Soc. de biol. 1916, LXXIX, S. 282, 710. — *Trillat A.* u. *Fouassier M.*, Compt. rend. Ac. Sc. 1914, CLVIII, S. 518—521. — *Trincas L.*, Soc. delle sc. med. e nat. Cagliari 1907; Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Ref. XLI, S. 316. — *Trommsdorff R.*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1902, VIII, S. 82—87. — *Tsuda K.*, Ebenda 1908, I. Abt., Orig. XLVI, S. 502—507; 1909, XLVIII, S. 277—284. — *Ulrichs B.*, D. med. Woch. 1919, Nr. 17, S. 468. — *Unna P. G.*, Zbl. f. Bakt. 1888, III; Dermat. Studien, H. 4. Voß, Hamburg 1887; Monatsh. f. prakt. Dermat. 1891, XII, S. 477; Med. Klin. 1909, Nr. 31; 1911, Nr. 10. — *Vahle C.*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1909, XXV, S. 178 bis 260. — *Versé*, Med. Klin. 1906, Nr. 24—26. — *Viehöfer A.*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., XXXIX, Nr. 8—14. Sep.-Abdr. S. 24—25. — *Vincent G.*, zit. bei *Besson*. — *Volto- lini*, Bresl. ärztl. Ztg. 1885, Nr. 15; Ref. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1885, II, S. 555—556. — *de Wäle H.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. L, S. 40. — *Wälsch L.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXXI, S. 503—511. — *Wagner*, Ebenda, XXIII, Nr. 11 u. 12, S. 433—438, 489—492. — *v. Wahl A.*, Ebenda 1903, XXXIII, S. 239—240. — *Waldinsky J. A.*, Ebenda 1912, LXVII, S. 222—224. — *Walter E.*, Ebenda 1912, LXIV, S. 136. — *Wehrli u. Knoll*, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1909, XIV, S. 135. — *Weichselbaum A.*, Wr. med. Woch. 1884, Nr. 12, S. 13. — *Weigert C.*, Zbl. f. d. med. Wiss. 1871, Nr. 49; Virchows A. 1881, LXXXIV. — *Weigl*, Archiv für Hygiene 1902, XLV, S. 273. — *Weil M. P.*, Rev. de la tuberc. 1913, X (II. Sér.), S. 412—416. — *Weinrich M.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1898, XXIV, S. 258. — *Weiß L.*, Berl. kl. Woch. 1909, S. 1797; M. med. Woch. 1909, S. 443. — *Welcke E.*, A. f. kl. Chir. 1899, LIX,

S. 129—143. — *Weltmann O.*, Wr. kl. Woch. 1915, Nr. 46, S. 1257. — *Werner S.*, M. med. Woch. 1914, S. 1838. — *Wesener F.*, Zbl. f. Bakt. 1887, I, S. 450; 1887, II, S. 131—135. — *v. Westenrijk N.*, Ebenda 1906, I. Abt., Orig. XLII, S. 181—184, 283—288. — *Wherry W. B.*, Ebenda 1913, I. Abt., Orig. LXX, S. 115—118. — *Whitney W. F.*, Boston Med. and Surg. J. 1903, May 7. — *Wilde*, Inaug.-Diss. Bonn 1896. — *Wirgin G.*, Zt. f. Hyg. 1904, XLVI, S. 149—168. — *Wirths*, M. med. Woch. 1908, Nr. 32, S. 1687—1690. — *Wirtz R.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Orig. XLVI, H. 8. — *van Wisselingh C.*, Pharm. Weekblad 1916, Nr. 33, 34; Ref. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1916, XXXIII, S. 199. — *Wolff E.*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1898, XV, S. 310 bis 312. — *Woloschin A. D.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXXII, S. 312—326. — *Wolters*, Ebenda, XIII, S. 469. — *Yamamoto J.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Orig. XLVIII, S. 253. — *Zeiß H.*, A. f. Hyg. 1913, LXXIX, S. 141—167. — *Zettnow E.*, Zt. f. Hyg., XXIV, S. 72—92; 1899, XXX; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1915, Orig. LXXV, S. 374—376. — *Ziehl*, D. med. Woch. 1882, S. 451; 1883, S. 62, 247. — *Zimmermann*, zit. bei *Grimme*. — *Zschokke E.*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1888, V, S. 465—470.

Zum Anhang: Negativdarstellung der Bakterien.

Arzt, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1910, Orig. LIV, S. 394—411. — *Benians T. H. C.*, zit. bei *Noguchi H.*, J. of exper. med. 1918, XXVII, S. 667—678. — *Bley H.*, Ebenda 1912, LXXVII, S. 206—221. — *Burri R.*, Das Tuscheverfahren. Jena 1909. — *Certes*, Bull. Soc. de Zool. de France 1888, XIII, S. 230. — *Eisenberg Ph.*, Klinisch-therapeutische Wochenschrift 1910, Nr. 5; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1910, Orig. LIII, S. 481—485; 1910, LVI, S. 183—186; 1913, LXXI, S. 421—422; Ebenda 1912, Ref. LIV, Beih. S. 145—147. — *Errera L.*, Bull. Soc. Belge de Microsc. 1884, X, S. 478. — *Fabre-Domergue*, Ann. de Microgr. 1889, II, p. 545. — *Fischer H.*, Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie 1910, XXVII, S. 475—476. — *Frühwald R.*, M. med. Woch. 1909, Nr. 49, S. 2523—2524. — *Gins H.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. LII, S. 620—625; 1911, LVII, S. 472—478. — *Hamm A.*, Ebenda 1907, XLIII, S. 287 bis 303. — *Hardouin J.*, Ebenda 1912, Ref. LIV, S. 344 (Compt. rend. Soc. de biol. 1912, LXXII, S. 298). — *Harrison*, Ref. D. med. Woch. 1913, S. 34. — *Hecht u. Wilenko*, Wr. kl. Woch. 1909, Nr. 26. — *Heim L.*, Lehrbuch der Bakteriologie, 5. Aufl., Enke, Stuttgart 1918. — *Kalb R.*, M. med. Woch. 1910, Nr. 26. — *Knack A. V.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1915, Orig. LXXVI, S. 235—236. — *Lenartowicz J. J.* u. *Potrzebowski K.*, Ebenda 1910, LVI, S. 186—191. — *Lipschütz B.*, Bakteriologischer Grundriß und Atlas der Geschlechtskrankheiten. Leipzig 1913. — *Mulzer P.*, Praktische Anleitung zur Syphilisdiagnose, 2. Aufl., Springer 1912. — *Nitsche P.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1912, Orig. LXIII, S. 575—576. — *Plaut*, M. med. Woch. 1910, Nr. 4, S. 215. — *Rulison*, J. Amer. Med. Assoc. 1910, LIV, Nr. 18; Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. XLVIII, S. 150. — *Sangiorgi G.*, Pathologica 1910, II, Nr. 34, S. 152—154; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1910, Orig. LV, S. 94—96. — *Schewiakoff*, zit. bei *v. Prowazek's* Taschenbuch der mikroskopischen Technik der Protistenuntersuchung. 2. Aufl. J. A. Barth, Leipzig 1909. — *Shimidsu K.*, Ebenda 1913, LXXI, S. 338—342. — *Solles*, Ebenda 1893; Ref. XIII, S. 670.

Über Vitalfärbung von Bakterien.

Von **Philipp Eisenberg**, Krakau.

Als „Vitalfärbung“ wird in der Histologie ein Komplex von Methoden bezeichnet, die die Färbung lebender pflanzlicher oder tierischer Substanz bezwecken. Seit mehr als einem halben Jahrhundert als Untersuchungsmethode eingeführt und seither nach vielen Richtungen weiter entwickelt, stellt sich die Vitalfärbungsmethode folgende Aufgaben: Zuerst will sie durch Färbung lebender Organismen einen Einblick in ihren Aufbau gewinnen, der durch postmortale Veränderungen, sowie die zur Färbung nötigen Prozeduren nicht getrübt wäre. Dieselben bezwecken zwar die Erhaltung und Veranschaulichung der natürlichen Struktur, können jedoch Veränderungen derselben oder gar Artefakte nicht immer vermeiden. Nun muß aber bemerkt werden, daß eine wirkliche „Lebendfärbung“ nur in beschränktem Maße möglich ist. Man sucht freilich gröbere Schädigungen der zu färbenden Objekte nach Möglichkeit zu vermeiden und wählt womöglich atoxische Konzentrationen der Farbstoffe; feinere, mit der Fortexistenz der Organismen verträgliche Schädigungen lassen sich dabei nicht ausschließen. Auch färben sich ja durchaus nicht alle Gewebe und nicht alle Zellbestandteile, Kerne z. B. färben sich meist gar nicht, solange sie am Leben sind (*Przesmycki* will lebende Kerne mit Neutralschwarz gefärbt haben). In pflanzlichen Zellen bilden die eindringenden Farbstoffe Niederschläge mit Gerbstoffen, Alkaloiden oder anderen Zellsaftbestandteilen, in tierischen Zellen färben sich meist granuläre Bestandteile, seltener wird diffuse Plasmafärbung erzielt. Es kann natürlich demnach nicht immer entschieden werden, ob, was sich färbt, auch lebt, vielmehr muß man in vielen Fällen annehmen, daß es tote oder paraplasmatische Zellbestandteile sind, die in einem lebenden Organismus oder einer lebenden Zelle den Farbstoff aufnehmen und daß manche Strukturen erst durch kolloidchemische Umsetzungen mit Zellbestandteilen entstehen. Nach *Pappenheim* werden durch die Vitalfärbung nur „akzidentelle lipoide Bestandteile der Zelle“ dargestellt, während am fixierten Präparat Eiweißstrukturen gefärbt werden sollen.

Ist somit der morphologisch-deskriptive Wert der Vitalfärbung nur ein beschränkter, so kann sie uns doch über manche physiologische Probleme wertvolle Aufschlüsse liefern, vor allem über Permeabilität verschiedener Zellarten sowie über ihre Funktionen, wie Sekretion,

Sauerstoffaufnahme und Sauerstoffverbrauch u. dgl. Es kann hier nur auf die grundlegenden Arbeiten von *Ehrlich*, *Heidenhain*, *Fischel*, *Overton*, *Ruhland*, *Küster*, *Höber*, *Goldmann*, *Schulemann* u. a. verwiesen werden.

Wenn man nun die Vitalfärbung bei Bakterien im strengen Sinne einer Lebendfärbung aufgefaßt haben will, so stößt man auf ziemlich verwickelte Verhältnisse und nicht leicht zu lösende Fragen. In seinem trefflichen Übersichtsartikel über Vitalfärbung sagt *Fischel*: „Eine scharfe Definition des Begriffes ‚vitale‘ Färbung und demzufolge auch eine Einschränkung der Zulässigkeit der Anwendungsweise dieser Bezeichnung läßt sich allerdings kaum geben, u. zw. deshalb nicht, weil man ein absolut sicheres, morphologisches Merkmal des ‚Lebens‘ histologischer Elemente nicht anzugeben vermag.“ Diese fundamentale Schwierigkeit macht sich bei Bakterien in ganz besonderem Maße geltend, u. zw. nach zwei Richtungen hin. Erstens wissen wir, daß alle Farbstoffe, welche imstande sind, lebensfeuchtes Bakterienmaterial (ohne Mitwirkung der meist toxischen Beizen) direkt zu färben, mehr oder minder ausgesprochene Bakteriengifte darstellen (*Koch*, *Behring*, *Boër*, *Buchner*, *Stilling*, *Jänicke*, *Kriegler*, *Churchman*, *Zeiß*, *Eisenberg*, *Browning* u. *Gilmour*, *Isabolinsky* u. *Smoljan*, *Römer*, *Gebb* u. *Löhlein*, *Krumwiede* u. *Pratt*, *Simon* u. *Wood*, *Shiga* u. a.). In stärkeren, prompt färbenden Konzentrationen werden die Lebensfunktionen sichtbar geschädigt oder ganz eingestellt. Wie weit diese Schädigung nach unten reicht, ist kaum ganz genau zu entscheiden, selbst die Feststellung der Beweglichkeit wird man nicht ganz sicher als Zeichen intakter Vitalität gelten lassen können. Die unschädlichen Konzentrationen wie sie z. B. meist in der Botanik und Zoologie verwendet werden (z. B. $\frac{1}{100\,000}$ bis $\frac{1}{1\,000\,000}$) und das Wachstum der Bakterien meist nicht mehr stören, färben Bakterien, wenigstens in kurzer Zeit nicht sichtbar, bei längeren Zeiträumen treten aber in den Kulturen mit Farbstoffzusatz komplizierte Degenerations- und Absterbeerscheinungen auf, die eine einwandfreie Beurteilung des vitalen Charakters der Färbung sehr erschweren. Es ist zweifellos, daß in vielen Fällen die Färbung mit einer Abtötung oder groben Schädigung der Bakterien verbunden ist. Ob eine deutliche, morphologischen Anforderungen genügende Färbung ganz intakter Bakterien, also keine „Krankfärbung“ möglich ist, müßte für jeden Farbstoff und für jede Bakterienart besonders festgestellt werden. Wir wissen nämlich, daß verschiedene Farbstoffe für eine Bakterienart, derselbe Farbstoff aber für verschiedene Bakterienarten in sehr verschiedenem Grade toxisch sein kann. Um ganz sicher zu gehen, müßte man imstande sein, bei jedem Individuum festzustellen, ob es über intakte Lebens- und Vermehrungskraft verfügt, da in einer Kultur, besonders bei schwächeren Farbstoffkonzentrationen ein Teil der Individuen stärker, ein anderer schwächer, der Rest gar nicht gefärbt ist. Diese Feststellung stößt bis jetzt auf große technische Schwierigkeiten.

Als Beweis der Lebensfähigkeit gefärbter Bakterien ist mehrmals ihre erhaltene Beweglichkeit angeführt worden. Mit Unrecht, denn es haben neuerdings *G. u. P. Hertwig* gezeigt, daß durch verschiedene Chemikalien, darunter auch basische Farbstoffe geschädigte Spermatozoen die Fähigkeit der Mitosebildung einbüßen können, ohne in ihrer Beweglichkeit beeinträchtigt zu sein. Für verschiedene Bakterienarten haben *Galeotti* sowie *Porcelli-Titone* gezeigt, daß die Vermehrungsfähigkeit bereits nach kurzer Bestrahlung mit der Quarzlampe aufhört, während zur Vernichtung der Beweglichkeit eine viel längere Einwirkung (bis 12mal) nötig ist. Auch nachträgliche Änderungen der erzielten Färbung, wie sie vielfach beschrieben und als Ausdruck vitaler Vorgänge aufgefaßt worden sind, insbesondere Abblassen der Färbungen, dürfen nicht ohneweiters als beweiskräftig anerkannt werden, da ja auch abgestorbenes oder geschädigtes Protoplasma noch Reduktionen auszuüben vermag. Es ist auch vielfach behauptet worden, man hätte von gefärbten Bakterien durch Verimpfen in frische Nährböden Kulturen bekommen. Die Untersuchung war aber hier global an größeren Bakterienmengen ausgeführt worden, so daß sie keine Gewähr dafür bietet, daß keine ungefärbten Individuen dem Untersucher entgangen sind, die sich in der frischen Kultur vermehren konnten. Beweisend wäre hier nur die individuelle Feststellung der intakten Lebensfähigkeit gefärbter Individuen. Das Tuscheverfahren von *Burri* (Einzellkultur) ist hier nicht anwendbar, da gefärbte Bakterien dabei entfärbt werden. Versuche mit der Methode von *van Schouten* oder *Barber* sind anscheinend noch nicht gemacht worden.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Sproßpilzen, auch hier ist vielfach Vitalfärbung beschrieben worden (*Ernst, Eisenschitz, Bokorny, Henneberg, Zikes*) ebenso bei Schimmelpilzen (*Marzinowsky*). Doch wird man auch hier nicht fehlgehen, anzunehmen, daß stärkere Färbungsgrade nur an lädierten Zellen erfolgen, und es wurde sogar auf diese Annahme ein Unterscheidungsverfahren zwischen lebenden und toten Hefezellen begründet, das jedoch praktisch nicht ganz eindeutig und zuverlässig erscheint (*Zikes*). *Bokorny* erwähnt, daß mit Methylviolett bzw. Methylenblau ziemlich intensiv gefärbte Hefezellen noch zu sprossen vermögen. *Zikes* sah in schwach gefärbtem Plasma Vakuolen mit schöner Färbung der darin enthaltenen Granula und Tanzkörperchen; wenn er aber diese mit Wahrscheinlichkeit als lebendes Plasma bezeichnet (wegen der Tanzbewegung? — diese wäre als physikalisch bedingt aufzufassen!), so wird man dies nicht ohneweiters akzeptieren. Paramäcien vermögen nach *Russel* in sehr schwachem Gentianaviolett (1 : 1.000.000) sich zu teilen, obgleich sie schwach gefärbt sind; in einer Lösung 1 : 500.000 bleiben dieselben 48 Stunden lang beweglich, wobei ihre Kerne intensiv gefärbt werden. Auch wachsende Gewebskulturen mit gefärbten Kernen und Kernteilungsfiguren sah dieser Autor in Plasma mit 1 : 20.000 Gentianaviolett.

Um es also kurz zusammenzufassen: es ist die Möglichkeit nicht ganz auszuschließen, daß besonders bei schwach toxischen Farbstoffen Konzentrationen gefunden werden können, die bestimmte Bakterien bereits sichtbar färben, ohne sie zu lädieren; streng bewiesen ist sie bis jetzt noch nicht. Dieser Forderung scheinen jene zahlreichen Versuche am nächsten zu kommen, in denen man Bakterien auf farbstoffhaltigen Nährböden gezüchtet hat (*Birch-Hirschfeld, d'Abundo, Roszahegy, Gasser, Reitz, Signorelli, Calandra, Péju u. Rajat, Krumwiede u. Pratt, Vay, Churchman, Eisenberg, Shiga, Isabolinsky u. Smoljan, Jansen, Hall u. Taber u. a.*). Man sieht dabei oft schon makroskopisch, daß gewisse Farbstoffe in den Kolonien kondensiert werden, mikroskopisch bemerkt man besonders in alternden Kulturen viele gefärbte Individuen (meist neben ungefärbten oder kaum gefärbten), die oft plasmolytische Erscheinungen darbieten. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es degenerierende Individuen sind, die den Farbstoff in stärkerem Grade aufnehmen, da schon *Buchner* seinerzeit nachgewiesen hat, daß durch Schädigungen der Färbungswiderstand lebender Bakterien überwunden wird. *Vay* hat auf Dahlia- oder Pfaublau-Agar (0.1—1.0‰) bei Typhus. Paratyphus und Koli gefärbte kugel- und bänderartige Einschlüsse in ungefärbten Bakterien gefunden, doch auch hier ist der vitale Charakter der Färbung nicht sichergestellt. Impft man nämlich lebenskräftige Bakterien auf den Farbstoffagar, so ist an jungen Individuen eine Zeitlang keine Färbung zu sehen; erst mit dem Altern der Kultur treten die teratologischen Fadenformen mit den gefärbten Einschlüssen auf. Wird mit alter Kultur beimpft, so ist das Wachstum ein spärliches und die gefärbten Fäden sind frühzeitig zu sehen (*Eisenberg*). Überhaupt ist das häufige Auftreten teratologischer Wuchsformen auf den farbstoffhaltigen Nährböden (*Vay, Eisenberg*) geeignet, den vitalen Charakter der beobachteten Färbungen in Frage zu stellen.

Verfolgt also die Vitalfärbung den Zweck, Bakterien lebend und unbeschädigt möglichst lebensgetreu zu färben, so müssen die bisherigen Erfolge der Vitalmethoden als problematisch bezeichnet werden. Ganz schwache Farblösungen färben lebenskräftige Bakterien überhaupt nicht, stärkere sind wegen ihrer Toxizität nicht ganz zuverlässig. Bezeichnet man mit *Krause* als Vitalfärbung nur jene Methoden, die bei erhaltener normaler Funktion der Zelle die dieser Funktion dienenden Organe der Zelle färben, so wäre bei der Vielseitigkeit der Funktionen der Bakterienzelle der Nachweis einer Vitalfärbung von Bakterien nur schwer zu erbringen. Trotzdem würde man diese Methode nur ungern unter den Methoden der Bakterioskopie missen wollen wegen der Vorteile, die sie bietet, nur muß man stets eingedenk bleiben, daß das Prädikat „vital“ cum grano salis aufzufassen ist. In vielen Fällen ist sicherlich an seine Stelle „postvital“ („supravital“) zu setzen oder die meines Erachtens gut zutreffende Bezeichnung „Frischfärbung“ (*Fülleborn*). Die Vorteile bestehen erstens in der Leichtigkeit und Einfachheit

der Ausführung, im Vermeiden der Fixation mit den damit verbundenen Deformationen (Schrumpfung des ganzen Bakterienleibs, besonders aber der zarten Schleimkapseln, Abreißen und Verquellen der Geißeln, Plasmolyse mit Zerklüftung des Protoplasten, Permeabilitätsänderungen), in der Möglichkeit, den Färbungsvorgang selbst mikroskopisch zu verfolgen bzw. an demselben Objekt Färbungs- und Entfärbungs- bzw. Umfärbungsprozeduren vornehmen zu können. Während die üblichen Färbungsmethoden uns meist überfärbte Bilder liefern, die die Bakterienzelle nur ungenügend differenziert darstellen, und zur Differenzierung erst besondere oft sehr eingreifende Maßnahmen nötig erscheinen, kann man bei vorsichtiger „vitaler“ Färbung viele Strukturdetails zu sehen bekommen, die sonst nicht zutage treten. Freilich muß man als Nachteil mit in den Kauf nehmen, daß die Bilder zum Teil vergänglich oder veränderlich sind, wohl infolge von intracellulären Reduktions- oder Oxydationsvorgängen, vielleicht auch infolge von Stoffverschiebungen in der Zelle.

Was die Farbstoffe betrifft, die auf diese Weise Bakterien anzufärben vermögen, muß bemerkt werden, daß die Permeabilität der Bakterienzelle in lebensfeuchtem Zustand geringer ist als in fixiertem, indem nicht alle Farbstoffe, die fixierte Bakterien eventuell unter Mitwirkung von Beizen zu färben vermögen, den Färbungswiderstand der lebenden eventuell lebensfeuchten Zelle zu brechen verstehen. Die verschiedensten basischen Farbstoffe färben fast alle, wie schon eben erwähnt, mit deutlicher Bevorzugung grampositiver Arten. Nur fast indifferente wie z. B. Rhodamin B färben sehr schwach aus stärkeren Lösungen, dabei wenig distinkt. Auch Methylgrün gibt eine kaum merkbare Färbung, u. zw. nur bei *Gram*-Positiven, die durch Alkalizusatz etwas verstärkt wird. Vielleicht ist die große Reduktionsempfindlichkeit des Farbstoffes (*Unna*) Schuld daran. Die basischen Färbungen sind meist prägnant und reich an Details, was ihre Verwendung empfiehlt. Von Säurefarbstoffen dringen Sulfofarbstoffe „vital“ gar nicht ein, von anderen färben Nitrofarbstoffe (*Aurantia*, *Pikrinsäure*) schwach und diffus unter Bevorzugung der *Gram*-Positiven, etwas stärker aber ebenfalls diffus Fluoresceinderivate (*Eosin*, *Phloxin*, *Rose bengale*, *Cyanosin*, *Methyleosin*, *Chrysolin*), u. zw. nur grampositive Arten in stark konzentrierten Lösungen. Auch Chromgrün und Echtgrün färben „vital“ nur *Gram*-Positive, das erstere deutlich, das zweite schwach. Andere Säurefarbstoffe versagten, soweit untersucht (*Eisenberg*).

Was die Technik der „Vitalfärbung“ (man kann diesen Namen mit dem oben erläuterten Vorbehalt anwenden, da eine Trennung „vitaler“ und „postvitaler“ Färbung schwer durchzuführen wäre) betrifft, wird dieselbe am einfachsten so ausgeführt, daß man eine Öse einer Suspension des zu untersuchenden Materials (in Wasser oder einem flüssigen Nährmedium) mit einer Öse der Farbstofflösung auf dem Objektträger mischt und mit einem Deckglas bedeckt. Suspension in eiweißhaltigen

Flüssigkeiten ist wenig empfehlenswert, da leicht entstehende gefärbte Eiweißniederschläge das Bild trüben und eventuell die Bakterien in ihr Maschwerk einschließen. Bei Untersuchung von Exkreten oder Körpersäften ist diese Eventualität schwer zu umgehen. Man kann auch einfach das zu untersuchende Kulturmateriail in der Farblösung suspendieren. Will man an ein und demselben Material verschiedene Farbreaktionen ausführen, so verschließt man zwei parallele Seiten des das ungefärbte Material bedeckenden Deckglases mit Kitt oder Wachs, läßt an einer freien Seite die Farblösungen bzw. Reagenzien zufließen und saugt mit einem kleinen Stück Fließpapier, das man an die andere freie Seite anlegt, dieselben durch das Präparat durch (*A. Meyer*). Man kann auch die Vitalfärbung im hängenden Tropfen beobachten, was aber wegen der ungleichmäßigen Schichtdicke sowie eventuellen Beweglichkeit weniger empfehlenswert erscheint. Zu morphologischen Untersuchungen über die Struktur wurden in Anbetracht ihrer geringen Toxizität meist Methylenblau sowie Neutralrot verwendet (*Ottolenghi, Ružička, Plato*). Die geeigneten Farbstoffverdünnungen lassen sich im allgemeinen nicht angeben, da sie nach Farbstoff, zu untersuchender Bakterienart, ihrem biologischen Zustand und je nach den darzustellenden Details wechseln. Auch dürfte es sich empfehlen an demselben Material verschiedene Konzentrationen auszuprobieren.

Um die Färbung noch schonender und diskreter zu gestalten, hat *Nakanishi* ein von *Cesaris Demel* für hämatologische Färbungen vorgeschlagenes Verfahren bei Bakterien angewendet. Er übergießt Objektträger mit gesättigter (am besten heißer) wässriger Methylenblaulösung, läßt den Farbstoff antrocknen und wischt dann soviel mit einem Tuch weg, daß der Objektträger eine himmelblaue Farbe aufweist. Auf den so präparierten Objektträger wird ein Tropfen Bakteriensuspension gebracht (*Nakanishi* verwendete meist mit Formalin fixiertes Material, wodurch der vitale Charakter der Färbung von vornherein wegfällt) und mit einem Deckglas bedeckt bzw. zur Verhütung der Verdunstung eingeschlossen. Der Farbstoff diffundiert allmählich in die Flüssigkeit und färbt die Bakterien langsam und diskret. Es können natürlich verschiedene Farbstoffe auch in alkoholischen Lösungen) Verwendung finden. So benutzten *Amato* sowie *v. Prowazek* u. *Keysseltz* Brillantkresylblau, *Pappenheim* Toluidinblau. *Unna* empfahl auf so präparierte Objektträger mit Trippereiter beschickte Deckgläschen aufzulegen zur Untersuchung auf Gonokokken. Neuerdings hat *Leporsky* in ähnlicher Anordnung Brillantkresylblau zur Vitalfärbung der Pallida vorgeschlagen, *v. Prowazek* u. *Keysseltz* zu demselben Zweck Brillantkresylblau und Methylenblau, *Zettnow* sowie *E. Hoffmann* für andere Spirochäten Methylenblau. *Mandelbaum* färbt die Pallida angeblich „vital“, indem er zum hängenden Tropfen des Materials eine Spur *Löfflers* Methylenblau und eine Öse $\frac{1}{10}$ -Normalnatronlauge zusetzt. Die Pallida soll sich dabei blaßblau färben (am Rand zu suchen!), andere Spiro-

chäten dunkelblau. *Meirowsky* verreibt Krystallviolett in physiologischer Kochsalzlösung zu einem Brei, den er dann in den zu untersuchenden syphilitischen Affekt einreibt. In dem hervortretenden Reizserum erscheinen die Spirochäten violett. Man kann auch Reizserum in vitro mit Farbkrystälehen verreiben. Neuerdings verwendet *Meirowsky* die Vitalfärbung nach *Nakanishi-Pappenheim*, als Farbstoffe benutzt er dabei Methylviolett, Krystallviolett, Gentianaviolett, Methylenblau, Kresylmethylenblau, Kresylechtviolett, Neutralrot oder eine Mischung von 0.25 g Methylviolett, 0.1 g Methylviolett in 20 cm³ 90%igen Alkohols. Außerdem erfolgt nach *Meirowsky* Vitalfärbung von Spirochäten in folgendem Farbgemisch: 30 cm³ 5%iger Boraxlösung werden 6 Stunden lang auf dem Wasserbad gekocht und sukzessive messerspitzweise folgende Farbstoffmengen darin aufgelöst: Methylviolett 3.8 g, Methylviolett BN 3.8 g, Methylviolett 6 B 4.5 g, Methylviolett 5 B 5.8 g, Methylviolett B 5.5 g. Neuerdings wurde die Formel vereinfacht zu: Methylviolett 5 g, Methylenblau 5 g, Methylviolett 30 g in 30 cm³ 5%iger Boraxlösung. Die Farblösung wird zwecks Sterilhaltung mit 0.25% Phenol oder Resorcin versetzt (fertig zu beziehen von *Grüblers* Laboratorium in Leipzig, Inhaber Dr. *Hollborn*). Die zu untersuchende Flüssigkeit wird auf einen Objektträger aufgebracht, ein Tröpfchen der Farbmischung zugesetzt, so daß eine dunkelviolette Färbung resultiert und mit einem Deckglas bedeckt, das mit einer Mischung von Wachs und Kolophonium verschlossen wird. Die Refringens-, Hühner-Balanitis-Spirochäten färben sich sofort intensiv, ebenso Kulturspirochäten aber nur schwach, Gewebsspirochäten brauchen längere Zeit (1—24 Stunden bis zur Färbung). Ihre Vitalität soll dabei ziemlich lange intakt bleiben (bis zu 12 Tagen Beweglichkeit, bei der Hühnerspirochäte auch Virulenz erhalten); freilich gelten auch hier die oben geäußerten Bedenken. Unbestätigt ist auch bisher die Angabe von *Meirowsky*, daß vitalgefärbte Tuberkelbacillen seitliche knospenförmige Auswüchse tragen, die dann frei werden und neue Bacillen reproduzieren sollen (*Muchsche* Granula?). Analoge Gebilde sollen auch Leprabacillen aufweisen, ebenso Paratyphus B- und Enteritisebakterien. Erwähnenswert erscheint auch die seither noch nicht bestätigte Beobachtung von *Marchand* sowie von *Nakanishi*, daß Tuberkelbacillen bei der Vitalfärbung leicht durch gewöhnliche Farblösungen gefärbt werden.

Von besonderen Differenzierungen der Zellbestandteile mittels der Vitalfärbung sei vor allem die Beobachtung der Kapsel in flüssiger Tusche oder Collargol oder Cyanochin erwähnt (s. den Anhang „Über Negativdarstellung von Bakterien“ im Kapitel: „Theorie der Bakterienfärbung“), wie sie von *Hamm*, *Arzt*, *A. Meyer*, *Eisenberg* empfohlen wird. Ebenso sei daran erinnert, daß Fettfärbungen am besten an unfixiertem Material vorgenommen werden (s. ebendasselbst Abschnitt über Fettfärbung). *Ponder* rät zur Darstellung der Volutin-

granula vital im hängenden Tropfen mit Toluidinblau zu färben, *Eisenberg* mit Nilblau oder Mansonblau.

Zur Darstellung „sauerstoffübertragender Körnchen“ in Milzbrandbacillen und anderen Bakterien haben *Dietrich* u. *Liebermeister* die Indophenolblau-(fälschlich Naphtholblau-)Synthese im vitalen Präparat empfohlen. Es wird eine frisch hergestellte 1%ige Lösung von Dimethylparaphenylendiaminchlorhydrat mit einer ebensolchen von α -Naphthol in 1%iger Soda zu gleichen Teilen gemischt, darin eine Spur Kulturmaterial verrieben und mit dem Deckglas bedeckt. Nach Untersuchungen von *A. Meyer*, *Eisenberg* sowie *Brandt* sind die Körnchen als Fett-(Lipoid-)Einschlüsse zu betrachten, denen vielleicht auch Oxydasefunktionen zukommen. Zu ihrer Indophenolblaufärbung haben *Schultze* sowie *Kramer* Agar mit Zusatz der erwähnten Stoffe empfohlen (2 Teile einer 2%igen Dimethylparaphenylendiaminchlorhydratlösung werden mit 1 Teil 1%iger alkalischer α -Naphthollösung gemischt, filtriert, dann 1 Teil des Gemisches mit 3 Teilen Nähragar gemischt und in Petrischalen ausgegossen). Auf den frisch hergestellten farblosen Nährboden wird lebenskräftiges Material aufgetragen, wo es bei Vorhandensein der Körnchen binnen kurzem sich bläut und bei mikroskopischer Untersuchung die dunkelblauen Granula im farblosen Zelleib erkennen läßt. Zur Feststellung von Reduktionsvorgängen verwenden dieselben Autoren einen ebenfalls farblosen Agar, der durch Vermischen von zwei Teilen Nähragar und einem Teil einer Mischung von 1%igem Paranitrosodimethylanilin und 1%igem α -Naphthol zu gleichen Teilen hergestellt wird. Bei Vorhandensein von Reduktionsvermögen werden die Bakterien grün gefärbt. Zur Feststellung der Oxydasefunktion der früher erwähnten Granula hat *Brandt* Vitalfärbung mit „Rongalitweiß“ (durch sulfoxylsaures Natrium reduziertes Methylenblau nach *Unna*, zu beziehen von Dr. *Grüblers* Laboratorium in Leipzig, Inhaber Dr. *K. Hollborn*) empfohlen. Man sieht dabei, wie in der sonst farblosen Bakterienzelle um die Granula herum das Leukomethylenblau zu Methylenblau oxydiert wird und allmählich im Zelleib sich verbreitet, wobei die Granula ihrer Fettnatur entsprechend das Methylenblau selbst nicht aufnehmen. Diese Beobachtungen lassen vielleicht die Deutung zu, daß es sich ähnlich wie bei den Eläoplasten mancher Pflanzen um plasmatische Hohlkugeln handelt, die die Fettropfen umgeben und Oxydasefunktionen ausüben. Damit würden auch die Bilder übereinstimmen, die die Viktoriablaumethode liefert (*Eisenberg*). Außerdem hat *Brandt* die Indophenolblausynthese dahin modifiziert, daß er gewöhnliche Agarkulturen den Einwirkungen der Dämpfe von Lösungen beider Komponenten aussetzt und so Blaufärbung der Granula erzielt. Jedenfalls wäre, wie bereits im Artikel „Theorie der Bakterienfärbung“ auseinandergesetzt wurde, daran festzuhalten, daß die von *Dietrich* u. *Liebermeister*, *Schultze*, *Kramer* und *Brandt* vertretene Ansicht, die in Rede stehenden Granula seien Oxydasegranula,

eines strikten Beweises bis jetzt entbehrt. Wie nämlich *Eisenberg* für Bakterien, *Fursenko* sowie *Oelze* für tierische Objekte (sog. Oxydasegranula der Leukocyten) hervorgehoben haben, könnten andere Teile der Zelle die Oxydationsfunktion besorgen und der auf diese Weise aus Indophenolweiß entstehende Farbstoff (Indophenolblau) würde dennoch infolge seiner elektiven Lipoidlöslichkeit von den Lipoidgranula gespeichert. Mit anderen Worten beweist die Indophenolfärbung nichts bezüglich der Lokalisation der Oxydase. Auch die starke Blaufärbung der Umgebung der Fettkugeln bei der Rongalitweißmethode (*Brandt*) beweist sie ebenfalls nicht, denn es könnte das irgendwo in der Zelle durch Oxydation entstandene Methylenblau von einer verdichteten Plasmahaut um die Fettkugeln herum gebunden werden. Ähnliche Erwägungen gelten überhaupt für mikroskopische Lokalisationen in der Zelle, die nur mit großer Vorsicht und wachsamer Kritik anzunehmen sind.

Literatur (zusammengestellt bis inkl. 1920; die Literatur der Kriegsjahre, insbesondere die französische, englische und italienische, infolge der Verhältnisse recht unvollständig): *d'Abundo*, zit. bei *Calandra*. — *Amato A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. XLVIII, S. 385—393. — *Arzt*, ibid. 1910, LIV, S. 394—411. — *Behring E.*, Gesammelte Abhandlungen. S. 194. Thieme, Leipzig 1893; Einführung in die Lehre von der Bekämpfung der Infektionskrankheiten. S. 494—495. Berlin 1912. — *Birch-Hirschfeld*, A. f. Hyg. 1888, VII, S. 341—353. — *Boër O.*, Zt. f. Hyg. 1890, IX, S. 479—491. — *Bokorny Th.*, Allg. Brauerei- u. Hopfenztg. 1905, Nr. 193. — *Brandt R.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXXII, S. 1—22. — *Browning C. H.* u. *Gilmour W.*, J. of Path. and Bact. 1913, XVIII, S. 144—145. — *Buchner H.*, Zbl. f. Bakt. 1890, VII, S. 733—736. — *Calandra E.*, ibid. I. Abt., 1910, Orig. LIV, S. 567 bis 574. — *Churchman J. W.*, J. of exper. med. 1912, XVI, S. 221—247; 1913, XVII, S. 373—378; 1913, XVIII, S. 187—188. — *Churchman J. W.* u. *Howard Michael*, ibid. XVI, S. 822—830. — *Dietrich A.* u. *Liebermeister G.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1902, Orig. XXXII, S. 858—865. — *Eisenberg Ph.*, ibid. 1909, XLIX, S. 471; 1909, LI, S. 115—121; 1913, LXXI, S. 420—503. — *Eisenschütz A.*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., I. — *Ernst P.*, Zt. f. Hyg. 1889, V; Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1902, VIII. — *Fälleborn F.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1914, Orig. LXXXIII, S. 432. — *Fursenko B.*, Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 1911, XXII, S. 97—101. — *Galeotti G.*, Ann. de l'Inst. Past. 1916, XXX, S. 49. — *Gasser J.*, A. de med. exper. et d'anat. pathol. 1890, II, S. 750—758. — *Hamm A.*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1907, Orig. XLIII, S. 287—303. — *Henneberg*, Woch. f. Brauerei 1912. — *Hertwig G. u. P.*, A. f. mikrosk. Anat. II. Abt., 1913, LXXXVIII, S. 267—306. — *Hoffmann E.*, Deutsche mediz. Woch. 1906, Nr. 22. — *Isabolinsky M.* u. *Smoljan L.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1914, Orig. LXXXIII, S. 413 bis 427. — *Jänicke*, Fortschr. d. Med. 1890, VIII, S. 460—468. — *Kramer G.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1912, Orig. LXII, S. 394—422. — *Krause R.*, Anat. Anz. 1904, XXIV, S. 400—403. — *Kriegler S. G.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1911, Orig. LIX, S. 481—490. — *Krumwiede Ch.* u. *Pratt J. S.*, ibid. 1913, LXVIII, S. 562—566; J. of exper. med. 1914, XIX, S. 20—27. — *Leporsky*, Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., Ref. XLV, S. 532. — *Mandelbaum M.*, M. med. Woch. 1907, Nr. 46. — *Marchand*, Zbl. f. Bakt. 1888, III, S. 449. — *Marzinowsky*, Zt. f. Hyg. 1913, LXXXIII. — *Meirousky*, M. med. Woch. 1913, Nr. 34, S. 1870—1873; Nr. 37, S. 2042—2044; Nr. 50, S. 2783—2784; Studien über die Fortpflanzung von Bakterien, Spirillen und Spirochäten. Springer, Berlin 1914. — *Meyer A.*, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. G. Fischer, Jena 1903; Die Zelle der Bakterien. G. Fischer, Jena 1912. — *Nakanishi K.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1901, XXX, S. 97, 145, 193, 225; M. med. Woch. 1900, Nr. 6. — *Ölze W. F.*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1914, XXXI, S. 43—50; A. f. mikrosk. Anat. I. Abt., 1914,

LXXXIV, S. 91—121. — *Ottolenghi D.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1904, Orig. XXXV, S. 546—553. — *Pappenheim A.*, Monatsh. f. prakt. Dermat. 1903, XXXVII; Morphol. Hämatologie. Folia haematol. 1917, XXII. — *Péju-Rajat*, Compt. rend. Soc. de biol. 1907, LXII, S. 954. — *Plato J.*, A. f. mikrosk. Anat. 1900, LVI, S. 868—917; Berl. kl. Woch. 1898, Nr. 45. — *Plato J. u. Guth H.*, Zt. f. Hyg. 1901, XXXVIII, S. 319 bis 331. — *Ponder C.*, Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Ref. LVI, S. 39—40 (Lancet 1912, Nr. 4636 [July 6]). — *Porcelli u. Titone F.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1915, Orig. LXXVI, S. 54—64. — *v. Prowazek*, Taschenbuch der mikroskopischen Technik der Protistenuntersuchung, 2. Aufl. J. A. Barth, Leipzig 1909. — *Przesmycki*, Compt. rend. Soc. de biol. 1915, LXXVIII, S. 63. — *Reitz A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Orig. XLV, S. 270—285, 374—384, 451—466; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1916, Ref. LXV, S. 145—164. — *Römer P. u. Gebb H.*, *Löhlein W.*, A. f. Ophthalm. 1914, LXXXVII, S. 1—111. — *Roszahégyi*, Zbl. f. Bakt. 1887, II, S. 418. — *Russel D. G.*, J. of exper. med. 1914, XX, S. 545—553. — *Ruzicka V.*, A. f. Hyg. XLVII, S. 337—389; LI, S. 281—318. — *Schulemann W.*, Zt. f. exper. Path. u. Ther. 1915, XVII, H. 3. — *Schultze W. H.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1910, Orig. LIX, S. 542. — *Shiga K.*, Zt. f. Immunitätsforsch. 1913, Orig. XVIII, S. 65—74. — *Signorelli E.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1912, Orig. LXVI, S. 469—480. — *Simon u. Wood*, Amer. J. of Med. Science. 1914, CXLVII, Nr. 503, S. 247. — *Smyth H. F.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXXI, S. 319—322. — *Stilling*, Anilinfarbstoffe als Antiseptika. Straßburg 1880. — *Uhma*, A. f. Dermat., L, H. 2. — *Unna P. G.*, Das Geheimnis des Methylgrüns in *Unna P. G. u. Golodetz L.*, Die Bedeutung des Sauerstoffs in der Färberei. Voß, Hamburg u. Leipzig 1912. — *Vay F.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1910, Orig. LV, S. 193. — *Zeiß H.*, A. f. Hyg. 1913, LXXIX, S. 141—167. — *Zikes H.*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1912, XXXI, S. 516. — Anmerkung: Weitere Literaturangaben findet man bei *Eisenberg*; die beste Zusammenstellung über Vitalfärbung im allgemeinen bei *Fischel*, Artikel „Vitale Färbung“ in der Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, 2. Aufl., I, S. 349—360. Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien 1910.

Methoden der Bakterienfärbung im Ausstrich.

Von Professor Dr. med. **Martin Ficker**, Berlin-Dahlem.

Mit 14 Abbildungen.

Wenn *Robert Koch* bei seiner ersten Großtat, der Begründung der Ätiologie des Milzbrandes, die mikroskopischen Probleme lediglich noch mit ungefärbten Präparaten im hängenden Tropfen lösen konnte, so erkannte er bei seinen weiteren Forschungen sehr bald die Unzulänglichkeit und Schwierigkeit dieser Art der Beobachtung. Nicht sowohl die Kleinheit der Bakterien, als vielmehr ihre Beweglichkeit und die Unmöglichkeit, in den in Haufen zusammengelagerten Mikroorganismen das einzelne Individuum zu erkennen, boten beträchtliche Hindernisse. Vor allem aber war sein Naturforschersinn darauf gerichtet, „die Bakterien in ihrer natürlichen Gestalt und Lagerung zu konservieren und Abbildungen herzustellen, welche von jeder willkürlichen oder unwillkürlichen Entstellung frei sind“.

War es *C. Weigert* gelungen, in Schnittpräparaten mit Hilfe von Hämatoxylin- und später von Anilinfarben Bakterien nachzuweisen, so ging *Kochs* Bestreben dahin, die Lücke zwischen dem unzureichenden Mittel der Beobachtung im Hängetropfen und den umständlichen und nicht allgemein anwendbaren Methoden der Schnittfärbung auszufüllen; er ging darauf aus, ein Verfahren anzuwenden, das eine sichere und scharfe Beobachtung der Bakterien mit Hilfe weniger und einfacher Manipulationen ermöglichte. So ließ er die bakterienhaltige Flüssigkeit in sehr dünner Schicht auf dem Deckglas eintrocknen, um die Bakterien in einer Ebene zu fixieren, behandelte dann die Schicht mit Farbstoffen, weichte sie wieder auf und schloß in Konservierungsmitteln ein. Zunächst glaubte *Koch*, daß das Trocknen die Gestalt der Bakterien bedeutend verändern müsse und daß ein Aufweichen nötig sei, um die ursprüngliche Form wieder zu erhalten. Er beobachtete aber bald, daß die Gestalt durch die Trocknung beständig blieb. Nach der Färbung saugte er die Farblösung mit Fließpapier möglichst vollständig ab und spülte sie mit destilliertem Wasser oder verdünnter Lösung von essigsauerm Kali fort. Aber ein Mangel hing noch dieser Methode an: die Bakterien schichten hafteten nicht immer am Glase, namentlich, wenn die Flüssigkeiten eiweißhaltig waren. Zwar gelang es ihm, durch längeres Aufheben der getrockneten

Präparate ein besseres Haften der Bakterienschicht am Glase zu erreichen, ebenso durch Härten mit Alkohol, aber die Zeit, in welcher dies Ziel zu erreichen war, schwankte so stark, daß diese Methode ihm nicht leistungsfähig genug erschien. Da wurde ihm *Ehrlichs* Methode der Erhitzung von Blutpräparaten bekannt: *Ehrlich* erhitzte die mit der angetrockneten Blutschicht beladenen Deckgläser eine bis mehrere Stunden lang auf 120—130°. Das führte *Koch* dazu, die Fixierung durch Erhitzen vor der Bakterienfärbung vorzunehmen. Zunächst gab er eine bestimmte Zeit nicht an, er fand, daß die Präparate bisweilen schon nach zwei Minuten, andere Male erst nach fünf bis zehn Minuten Erhitzen genügend fixiert waren. Später ist dann von ihm die Fixation für Tuberkelbacillenpräparate auf 20 Minuten im Trocknenkasten bei 110° angegeben, gleichzeitig aber die bei weitem bequemere Methode des Fixierens in der Flamme empfohlen worden. Damit waren die Grundlagen gegeben, deren wir uns noch heute bedienen.

I. Vorbereitendes.

1. Deckgläser und Objektträger.

Für die Herstellung von Ausstrichpräparaten benutzt man Deckgläser oder Objektträger.

1. **Deckgläser.** Das übliche Format ist das quadratische mit 18 mm Seitenlänge. Die Dicke soll höchstens 0.16 mm betragen, zu dünne Deckgläser zerbrechen leicht.

Fig. 105



Deckglaspinzette nach Kühne.

Reinigung. Neue Deckgläser bedürfen in der Regel einer besonderen Reinigung nicht (es sei denn, es handelt sich um Geißelfärbungen; bei diesen ist stets eine rigorose Vorbehandlung nötig, siehe unten), man wischt sie nur mit einem sauberen Läppchen (dünne alte Leinwand, Leder od. dgl.) ab. Ein aufgebracht Wassertröpfchen muß sich flach ausbreiten, es darf nicht beim Ausstreichen in toto den Ort wechseln und sich kugeln. Deckgläser dürfen nur an den Kanten, nicht an den Flächen mit den Fingern angefaßt werden, am besten bedient man sich der Deckglaspinzetten von *Cornet*, *Kühne* oder *Ehrlich*.

Reinigung von fetthaltigen Deckgläsern.

1. Einlegen in **Alkohol**. Vor Gebrauch abwischen mit Läppchen oder noch besser: Alkohol abtropfen lassen, Rest in Flamme abbrennen; oder

2. putzen mit Xylol oder Benzin; oder
3. putzen mit (heißem) Wasser und Seife, Wasserspülen, trocknen; oder
4. einlegen für $\frac{1}{2}$ Stunde in eine Chromatmischung (chromsaures Natron 1, 25%ige Schwefelsäure 4), reichlich Wasser spülen, erst Leitungs- dann destilliertes Wasser, trocknen; oder
5. durch Erhitzen:
 - a) im Trockenschrank gelegentlich des Trockensterilisierens von Glassachen;
 - b) direkt über der nicht leuchtenden Bunsenflamme oder mittels Durchziehens durch die Flamme (10—20mal). Bei letzterem

Fig. 106.



Deckglaspinzette ohne Schieber nach P. Ehrlich.

Verfahren springen die Deckgläser leicht, man muß dabei langsam erkalten lassen, indem man die erhitzten Gläser höher und höher über der Flamme hält oder indem man sie warm auf einen schlechten Wärmeleiter legt (Holz, Kork, Papier). Sie springen ebenfalls weniger leicht, wenn man sie auf einem Drahtnetz oder einem dicken Blech über der Flamme erhitzt und auf diesem erkalten läßt.

Fig. 107.



Deckglaspinzette mit Schieber nach P. Ehrlich.

Reinigen von Deckgläsern für die Geißelfärbung.

I. Ich empfehle folgendes Verfahren:

1. Einlegen in Chromatschwefelsäure für einen Tag (chromsaures Natron 1 Teil, 25%ige Schwefelsäure 4 Teile);
2. reichlich Leitungswasser spülen, bis Wasser nicht mehr sauer;
3. spülen mit mehrfach erneuertem destillierten Wasser;
4. aufbewahren in absolutem Alkohol;
5. vor Gebrauch: Entnahme mit Pinzette; unter Glasglocke senkrecht stellen auf Fließpapier und hier trocknen lassen.

Ich vermeide jedes Anfassen mit den Fingern und jedes Abputzen mit Läppchen. Bei 1 ist dafür Sorge zu tragen, daß die Chromatschwefelsäure mit den Glasflächen wirklich in Berührung kommt, man nimmt flache Abdampfschalen und rührt mehrfach mit Glasstab um. Nicht zu

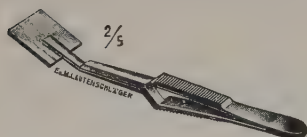
viel Deckgläser auf einmal in die Chromatschwefelsäure! Man kann auch nach 1 mit Natron- oder Kalilauge spülen und dann wie oben fortfahren. Einen Rest Alkohol bei 5 kann man über der Flamme zum Abdunsten bringen.

II. Eine sehr zuverlässige Methode ist auch die von *Peppler* angegebene:

1. Kochen in 4%iger Kaliumpermanganatlösung eine Viertelstunde (in Porzellanschale oder irdenem Topf) unter Umrühren mit Holzstab;

2. abwaschen mit Wasser;

Fig. 108.



Deckglaspinzette (Münchener Modell).

Fig. 109.

Deckglaspinzette nach *Cornet*.

3. kochen in verdünnter Salzsäure (1:4) $\frac{1}{2}$ Stunde unter dem Abzug;

4. abwaschen mit Wasser, bis Waschwasser nicht mehr sauer (gegen Lackmuspapier);

5. mit Alkohol bedecken, diesen durch neuen ersetzen;

6. anfassen mit Schmelztiegelzange oder Pinzette, abbrennen über der Bunsenflamme.

Fig. 110.

Deckglaspinzette nach *Cornet*.

III. Zur Abkürzung des unter I geschilderten Verfahrens kann man die Deckgläser in der Chromschwefelsäure einmal oder mehrmals kochen. Diese Behandlung empfehlen *v. Ermenghem*, *Hinterberger*, *Zettnow*, *Gemelli* u. a.

a) Deckglasreinigung nach *v. Ermenghem*.

1. Eine 6%ige Schwefelsäure ist kalt zu mischen mit 6%iger Lösung von Kaliumbichromat. Hierin sind die Deckgläser unter Umrühren mit Glasstab mehrmals zu kochen;

2. Wasser spülen;

3. einlegen in Alkohol. Vor Gebrauch unter einer Glocke in aufrechter Stellung trocknen.

Man kann auch nach dem Alkohol eine Nachbehandlung mit Äther folgen lassen und die Deckgläser dann in weithalsiger, gut verschließbarer Flasche unter Äther bis zum Gebrauch aufbewahren. Man zieht sie

mit ausgeglühter Pinzette heraus, faßt sie mit Cornetpinzette und läßt den Äther über der Flamme verdunsten (ohne daß er brennt), erhitzt sie kurz im oberen Teil der Flamme und läßt sie langsam abkühlen (*W. Kuntze*).

b) Verfahren von Hinterberger.

Deckgläser zweimal 10 Minuten lang kochen in Lösung von 15 g Kal. bichrom. und 15 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und 250 cm^3 Wasser in einem Becherglas mit herausnehmbarem Glasrost. Säure abgießen. Mit Wasser spülen. Mit destilliertem Wasser zweimal aufkochen. Ersetzen durch absoluten Alkohol, der erneuert wird. Aufbewahren in Alkohol.

c) Zettnow fügt zu einer 10%igen Kaliumbichromatlösung 10%ige Schwefelsäure und kocht hierin die Deckgläser 10 Minuten lang, darnach

Fig. 111.



Objektträgerpinzette

spülen mit verdünnter Natronlauge 5 Minuten lang. Nochmals kochen in Chromatschwefelsäure und spülen mit Natronlauge. Darnach Wasser, Alkohol.

IV. *G. de Rossi* kommt mit Schwefelsäure ohne Chromzusatz aus. Mit Alkohol reinigen. 10—15 Minuten in siedender Schwefelsäure halten. Reichlich Wasser spülen, dann in Alkohol und Benzin zu gleichen Teilen, abwischen mit reinem Tuch, mit Pinzette fassen und 40—50mal durch die Bunsenflamme ziehen.

Reinigen gebrauchter Deckgläser.

Entweder: 1. Kochen in Sodalösung;

2. abspülen mit Wasser;

3. einlegen in Salzsäure;

4. abspülen mit Wasser;

5. einlegen und aufbewahren in Alkohol;

6. abtrocknen mit Lappen oder trocknen durch Abbrennen des Alkohols.

Oder: 1. Einlegen in konzentrierte Schwefelsäure;

2. waschen mit Wasser;

3. kochen in Soda- oder Kalilauge oder in Pottasche;

4. waschen mit Wasser;

Eventuell 5 und 6 wie oben.

Oder: Einlegen für mehrere Tage in eine Chromatschwefel-

säure (s. S. 269), darnach reichlich Wasser spülen, kochen in Soda-lösung, Wasser spülen u. s. w.

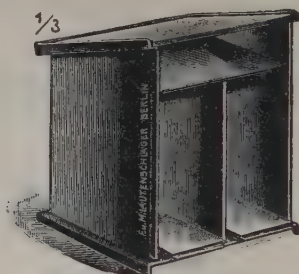
Tuberkelbacillen werden zerstört durch mehrtägiges Aufbewahren in einer Mischung zu gleichen Teilen von konzentrierter Schwefelsäure und Müllerscher Lösung (1 g Natriumsulfat und 2.5 g Kaliumbichromat und 100 cm³ Wasser).

Objektträger.

Das übliche Format ist von der Größe 26×76 mm. Die Dicke soll 1.0—1.2 mm betragen. Dickere als 1.5 mm sind nicht brauchbar.

Seit A. Neisser (a) die Objektträger an Stelle von Deckgläsern für Gonokokkeneiterausstriche verwendete, haben sie sich mehr und mehr für das gefärbte Ausstrichpräparat eingebürgert, sie sind weniger leicht zerbrechlich und einfacher zu handhaben, sie sind auch billiger, selbst

Fig. 112.



Behälter für Objektträger und Deckgläser.

wenn man den vermehrten Reagenzienverbrauch in Rechnung zieht. Man kann auf einem Objektträger eine ganze Reihe von Ausstrichen fertigen, zweckmäßig wird vorher der Objektträger nach Anwärmen mittels Fettstiftes durch horizontale und vertikale Linien in Felder eingeteilt, auch können die Ausstriche die Form von Ziffern, Buchstaben oder Figuren erhalten.

Reinigung wie bei Deckgläsern.

2. Die gebräuchlichsten Farblösungen und ihre Herstellung.

A. Einfache Lösungen.

1. Gesättigte alkoholische Lösungen.

Am praktischsten ist es, sich zum mindesten von den drei gebräuchlichsten Farben: Fuchsin, Methylenblau, Gentianaviolett alkoholisch gesättigte Stammlösungen herzustellen. Man benutzt fest verschließbare Flaschen aus gutem Glase und übergießt etwa 10—15 g Fuchsin mit 100 cm³ Alkohol von 96%, bei Methylenblau 10—15 g, bei

Gentianaviolett 6—8 g. Man schüttelt am Tage mehrmals um und hat dann schon am nächsten Tage die konzentrierte oder gesättigte alkoholische Lösung.

2. Alkoholisch-wässrige Lösungen.

Von der filtrierten alkoholisch gesättigten Lösung versetzt man einen Teil mit vier Teilen destillierten Wassers.

In vielen Fällen (Nachfärbungen u. s. f.) reichen auch stärkere Verdünnungen (1 Teil alkoholisch gesättigte Lösung und 9—10 Teile Aqua destillata) aus. Diese stärkeren Verdünnungen sind allerdings weniger gut haltbar.

3. Rein wässrige Lösungen.

Man nimmt 1 oder 2 g Farbe auf 100 cm³ Wasser. Man kann sich aber auch wässrig gesättigte Lösungen vorrätig halten und diese dann wie unter 2 verdünnen. Filtration vor Gebrauch.

B. Zusammengesetzte und verstärkte Farblösungen.

1. Carbolfuchsin nach Ziehl-Neelsen.

10 cm³ alkoholisch gesättigte Fuchsinlösung,

100 cm³ 5%ige Carbollösung (hergestellt aus Ac. carbol. liquef.).

Von diesem „konzentrierten Carbolfuchsin“ stellt man mit destilliertem Wasser eine (5—)10fache Verdünnung her, die eine Universalfarbe darstellt („verdünntes Carbolfuchsin“). Beide Lösungen sind gut haltbar.

2. Löfflers Methylenblau (Löffler, a).

30 cm³ alkoholisch gesättigte Methylenblaulösung,

100 cm³ Kalilauge 0.01%ig (d. h. auf 100 cm³ Aqua dest. 1 cm³ 1%ige Kalilauge).

3. Anilinwasser-Farblösungen (Ehrlich, b).

Gebräuchlich sind vor allem:

Anilinwasser-Gentianaviolett,

Anilinwasser-Fuchsin.

5 cm³ Anilinöl werden mit 100 cm³ destilliertem Wasser einige Minuten kräftig geschüttelt. Filtration durch mit destilliertem Wasser angefeuchtetes Filter. 100 cm³ des klaren Filtrats („Anilinwasser“) erhalten 11 cm³ alkoholisch gesättigte Gentiana- bzw. Fuchsinlösung. Vor Gebrauch filtrieren. Die Lösungen sind je nach Güte der verwendeten Reagenzien sowie des Glases verschieden lange haltbar. Für subtilere Färbungen benutzt man sie in der Regel erst nach 24stündigem Stehen und nachfolgender Filtration. Bei Färbung von Tuberkelbacillen, überhaupt bei Färbemethoden, in deren Verlauf durch geeignete Entfärbungsverfahren ein Auswaschen der Niederschläge erfolgt, dürfen die Anilinwasserfarben auch sofort nach der Herstellung und Filtration verwendet werden. Oft liegt das Entstehen von Niederschlägen nicht an der Farbe, sondern an ungenügend gereinigten Deckgläsern bzw. Objekt-

trägern. Sind die Aufbewahrungsflaschen aus bestem Glas und waren die Bestandteile der Lösungen rein, so kann man bei gutem Verschuß der Flaschen damit rechnen, daß die Anilinwasserfarblösungen ein bis zwei Wochen haltbar sind. Aber darauf verlassen darf man sich nicht. Aus diesem Grunde ist es vorzuziehen, die Lösungen immer frisch herzustellen. Dabei braucht man genaue Abmessungen nicht vorzunehmen: Von reinem Anilinöl wird in ein sauberes Reagensglas so viel gegossen, daß die untere Kuppe voll ist (ca. 1 cm^3). Hierzu gießt man destilliertes Wasser fünf Finger breit ($15\text{--}20\text{ cm}^3$), setzt den Daumen auf die Röhrchenöffnung und schüttelt 1—2 Minuten kräftig durch. Filtration durch angefeuchtetes Filter. Vom klaren Anilinwasser gießt man eine Portion in ein Schälchen und fügt soviel frisch filtrierte alkoholisch gesättigte Farblösung (Fuchsin, Gentianaviolett) zu, bis die Oberfläche ein schillerndes Häutchen zeigt.

Carbolgentiana- oder Methylviolett (von Löffler wird Methylviolett 6 B oder BN besonders empfohlen). 100 cm^3 Carbolwasser $1\text{--}2\frac{1}{2}\%$ ig, frisch bereitet, hierzu 10 cm^3 gesättigte alkoholische Lösung der Farbe. Eine weitere Verstärkung erfährt Carbolmethylviolett (6 B), wenn zu 10 cm^3 der Farblösung 1 cm^3 alkoholische Methylenblaulösung zugesetzt wird (Löffler).

Carbolglycerinfuchsin nach Czaplewski. 1 g Fuchsin in Reibschale mit 5 cm^3 Ac. carbol. liquef. gut verreiben, allmählich 50 cm^3 Glycerin zusetzen. Verdünnen mit 100 cm^3 Aqua dest. Die Farbe ist gut haltbar.

Carbolmethylenblau nach Kühne. $1\text{--}5\text{ g}$ Methylenblau, 10 cm^3 Alcohol absol., 100 cm^3 5% iges Carbolwasser.

Boraxmethylenblau nach Manson. Methylenblau med. pur. Höchst $2\cdot0$, Borax $5\cdot0$, lösen in $100\cdot0$ kochenden Wassers.

Carbolthionin nach Nicolle. 10 Teile gesättigte alkoholische (50% ige) Lösung von Thionin und 100 cm^3 Carbolwasser 1% ig.

Jodhämatoxylin soll nach Feeser für Bakterienausstrichpräparate ebenso gut zu gebrauchen sein wie die Anilinfarben. Farblösung: 3 g Hämatoxylin, 20 cm^3 absoluter Alkohol, 60 cm^3 gesättigte Alaunlösung, 2 cm^3 alkoholische Jodlösung. Die Farblösung ist schon wenige Tage nach der Herstellung brauchbar. Färben über der Flamme 1—2 Minuten, dann abspülen in 50% igem Alkohol und Wasser.

Eine anerkannt zuverlässige Firma für Bezug von Farbstoffen ist die Firma Dr. G. Grübler (Dr. Karl Hollborn), Leipzig.

Sehr bequem sind die Farbstofftabletten und ferner die von E. Friedberger angegebenen, bei P. Altmann-Berlin erhältlichen Farbstifte, die dauernd haltbar, immer gebrauchsfertig und wie Taschenbleistifte transportabel sind, sie eignen sich besonders für Reisen, Tropen, fürs Feld u. s. w. Das fixierte Präparat wird mit Wasser bedeckt, es genügt dann ein einmaliges Eintauchen und Umrühren des Stiftes, um die Färbung zu erreichen.

II. Das gefärbte Ausstrichpräparat.

1. Schema der Herstellung gefärbter Ausstrichpräparate von Kulturen auf festen Nährböden.

1. Aufbringen einer Öse reinen Wassers auf die Mitte des Deckglases.

2. Entnehmen einer sehr kleinen Menge des Kulturmateri als mit der Spitze einer ausgeglühten Platinnadel.

3. Verteilen des Materials in dem Tröpfchen und Ausstreichen zu dünner Schicht.

4. Lufttrocknen werden lassen.

5. Dreimal durch die nichtleuchtende Bunsenflamme ziehen.

6. Auftropfen von Farbe.

Färbedauer: verdünntes Carbolfuchsin 3—5 Minuten. *Löfflers* Methylenblau 4—8 Minuten.

7. Abspülen mit Wasser.

8. Trocknen zwischen Fließpapier.

9. Einschließen in Zedernöl oder Kanadabalsam.

2. Ausstrichpräparate von Kulturen auf flüssigen Nährböden, ferner von Blut, Eiter, Sputum, Gewebssäften, Pflanzeninfusen u. s. w.

a) Ausstreichen einer Öse oder Nadelspitze direkt auf dem Glas ohne Wasser zu dünnster Schicht unter flachem Auflegen des Platindrahtes, dann weiter wie vorn 4—9.

b) *Abziehpräparate*. Bei Präparaten von Blut, Eiter, Sputum u. s. w. kann man sich des Abziehverfahrens bedienen. Man gibt auf Deckglas (oder Objektträger) ein kleines Tröpfchen (Öse) Blut (Eiter, Sputum), legt ein zweites Deckglas (oder Objektträger) auf, drückt ganz leicht an und zieht nun beide in wagrechter Richtung voneinander ab. Die aufgetragene Materialmenge muß gering sein, da man sich sonst die Finger infizieren kann. Um das zu vermeiden, kann man Deckglaspinzetten zu Hilfe nehmen oder aber man legt die Deckgläser so übereinander, daß ein Achteck (Stern) entsteht, dann lassen sie sich abziehen, ohne daß die Finger beschmutzt werden. Ist das Material sehr konsistent, so wird man zweckmäßiger Objektträger anwenden.

Meist bekommt man mit diesem Verfahren recht gute Ausstriche. Für Blutpräparate ist heute das folgende gebräuchlicher.

c) *Herstellung von Blutausstrichen*. Man bringt ein kleines Tröpfchen des gerade frisch entnommenen Blutes auf eine Kante eines Deckglases, setzt es im spitzen Winkel (30—50°) auf das rechte Ende eines in der linken Hand gehaltenen Objektträgers auf — in diesem Moment läuft das Blut der Kante entlang — und streicht in der dem spitzen Winkel entgegengesetzten Richtung, in diesem Falle also von rechts nach links, ohne abzusetzen in einem Zuge über die Fläche nach

dem anderen Ende zu. Setzt man das Deckglas zu steil auf, so wird die Schicht zu dick.

Man kann auch das Deckglas an dem anderen Ende des Objektträgers aufsetzen und in der Richtung des spitzen Winkels ausstreichen.

Hat man das Tröpfchen Blut von vornherein auf den Objektträger gegeben, so hält man ihn mit dem Tropfen nach oben in der linken Hand, bringt mit der rechten die Kante eines Deckglases oder eines zweiten Objektträgers unter spitzem Winkel an den Tropfen, läßt das Blut zunächst der Kante des Deckglases bzw. Objektträgers entlang laufen und streicht dann wie oben aus.

Je dünner die Schicht ist, umso schneller erfolgt das Antrocknen des Blutes.

Über Fixierung von Blutpräparaten s. S. 278 und 279.

Bei der Färbung von Blutpräparaten folgt man den zum Nachweis von Blutparasiten angegebenen Methoden, hier sei lediglich auf die von Vincent zur Bakteriendarstellung empfohlene Methode hingewiesen.

Färbung von Blutpräparaten nach M. H. Vincent zum Bakteriennachweis.

1. Das trockene Präparat einlegen für $\frac{1}{2}$ —2 Minuten in 30 cm^3 Glycerin + 30 cm^3 in der Kälte gesättigte Kochsalzlösung + 6 cm^3 5%ige Carbolsäure (filtriert).

2. Auswaschen in Wasser (destilliert).

3. Färben in Carbolmethylenblau + 1—2%iger wässriger Methylviolettlösung.

Das Hämoglobin wird gelöst, auch vereinzelte Bakterien kommen zur Darstellung, da sie nun nicht mehr durch die roten Blutkörperchen verdeckt werden.

d) Organausstrichpräparate. Man faßt das Organ mit steriler Pinzette, legt mit steriler Schere oder sterilem scharfen Messer eine frische Schnittfläche an und wischt mit dieser ganz leicht über Deckglas oder Objektträger in einem Zuge weg. Trocknen. Flammenfixation u. s. f.

e) Tupfpräparate. Nach Anlegen einer frischen Schnittfläche eines Organs drückt man diese in vertikaler Richtung gegen das Deckglas oder den Objektträger sanft an, ohne auszustreichen. Bei konsistenterem Material ist der Druck zu verstärken. Trocknen. Fixieren u. s. f.

Bei diesem Verfahren wird das Auseinanderziehen von Zellen und Zellkernen (Kometenschweife!) vermieden.

f) Gewebssaftausstriche. Von einer frischen Schnittfläche eines Organs streicht man mit scharfem Messer Gewebssaft ab und trägt davon eine dünne Schicht auf Deckglas auf. Lufttrocken werden lassen u. s. w.

g) Bei Ausstrichpräparaten von Milch verfährt man zunächst so wie bei solchen von flüssigen Kulturen, Eiter u. s. w. läßt aber nach dem Fixieren mehrmals Äther über den Ausstrich laufen zur Entfernung des MilCHFettes, darnach Färbung (sehr geeignet ist Methylenblau).

3. Bemerkungen zu der schematischen Vorschrift.

1. Die Bakteriensuspension.

Zum Suspendieren der Bakterien vor dem Ausstreichen nimmt man frisch aus der Leitung entnommenes oder sterilisiertes Leitungswasser. Bouillon gibt Niederschläge. Kochsalzlösung empfiehlt sich nicht wegen Zelledstruktionen beim Eintrocknen infolge hoher Salzkonzentration. Destilliertes Wasser wird vermieden, weil beim Übertragen der Kulturbakterien vom salzreichen Medium in das salzfreie plasmolytische Vorgänge zu befürchten sind.

Die Suspension darf nicht zu dünn und nicht zu dicht sein. Man überträgt soviel Kulturmaterial, daß das Wassertröpfchen gegen dunklen Untergrund deutliche graue Trübung aufweist und daß die Deckglasschicht nach Ausstreichen und Trocknen einen zarten grauen Schleier bildet.

Beim Ausstreichen von SporenmateriAl nimmt man mehr, beim Färben von Geißeln weniger MateriAl.

2. Das Trocknen.

Die Trocknung durch Erwärmen zu beschleunigen empfiehlt sich im allgemeinen nicht, da leicht Destruktionen eintreten. Allenfalls darf man eine ganz mäßige Erwärmung durch Bewegen des Präparates hoch über der Flamme vornehmen. Schonender ist es, das Präparat in die Nähe der Flamme zu stellen, dann trocknet es schneller durch den aufsteigenden Luftstrom. Die größte Beschleunigung aber erreicht man dadurch, daß man von vornherein nur einen kleinen Wassertropfen zum Suspendieren der Bakterien nimmt, der beim Ausbreiten eine sehr dünne Schicht ergibt.

III. Fixation von Ausstrichpräparaten.

1. Durch Wärme.

1. Die Fixation geschieht in der Regel, indem man das lufttrockene Präparat dreimal durch die nichtleuchtende Bunsenflamme (oder Spiritusflamme) zieht. Bestrichene Seite nach oben. Nicht zu schnell, sonst findet keine Fixation statt; nicht zu langsam, sonst verbrennt das Präparat, etwa mit der Geschwindigkeit, „mit der man Brot schneidet“. Man kann die Fixationsvorschrift auch so ausdrücken: man beschreibe mit der Hand dreimal einen vertikal oder horizontal gestellten Kreis, der einen Fuß im Durchmesser hat und den die Hand jedesmal in einer

Sekunde zurücklegt. Die Hitze darf keinesfalls zu stark einwirken. Also nicht in der Flamme verweilen, sondern stetig bewegen.

Für bestimmte Sporenarten (s. Sporenabschnitt) empfiehlt sich das Durch-die-Flamme-ziehen mehr als dreimal vorzunehmen.

Bei Geißelfärbungen begnügt man sich damit, zweimal durch die Flamme zu ziehen, man faßt dabei das Deckglas mit den Fingern an, um zu starke Erwärmung zu verhüten.

Man kann auch einen Objektträger durch mehrmaliges Durchziehen durch die Flamme stark erhitzen und diesen in einer Entfernung von 2—3 cm etwa 1 Minute über das Deckglas halten.

2. Will man bei der Hitze-fixation Zeit und Wärme genau dosieren, so empfiehlt sich die alte Methode anzuwenden, nämlich 2—10 Minuten lang im Trockenschrank auf 120—130° zu erhitzen.

Man achte darauf, daß die Ausstriche bei jeder Art der Hitze-fixation gut lufttrocken sind. Sind sie noch feucht, so wirkt die feuchte Hitze destruktiv.

3. Eine Fixation von Bakterien an Deckglas oder Objektträger ohne Trocknen empfiehlt G. v. Wendt. Das Deckglas oder der Objektträger werden mit einer äußerst dünnen Schicht von Meyers Eiweißglycerin überzogen, dann mit Tröpfchen Wasser versehen, in welchem man das Bakterienmaterial verteilt. Nun in feuchter Kammer halten 20—30 Minuten, und darnach für 8—10 Minuten bei 75° einstellen unter peinlichem Schutz vor Wasserverdunstung. Die Bakterien, die sich während des Stehenlassens abgesetzt hatten, werden so durch die Koagulation der Eiweißschicht am Glase festgehalten.

2. Fixation durch Chemikalien.

Die Fixation durch Chemikalien ist bei der Färbung von Bakterienausstrichen noch verhältnismäßig wenig im Gebrauch, sehr mit Unrecht. Man würde bei rein morphologischen Problemen sicher oft weiter gekommen sein, hätte man von der konventionellen Hitze-fixation Abstand genommen. Für Kapseldarstellungen, Polfärbungen, für Studien über die Kernfrage, Protoplasmainschlüsse, ja auch für Geißelfärbungen wird man mehr und mehr der exakteren Fixation durch bestimmte Reagenzien den Vorzug geben müssen, ebenso für Blutausstriche.

Die Fixation durch Lösungen und Dämpfe bei Bakterienausstrichen folgt ganz und gar derjenigen von Protozoenpräparaten, es sei hier auf diese verwiesen. Hier sollen lediglich die wichtigsten der für Bakterien in Betracht kommenden Methoden aufgezählt werden, von ihnen sind die Methoden I, 1—3 vor allem für Blutausstriche, die Methoden II, 1, 2, 7 und 8 für morphologische Studien am Platze. Die Osmiumsäurefixation ist besonders mit Hinblick auf die Kapseldarstellung geübt worden, sie soll ausführlicher schon hier geschildert werden, weil sie auch für andere Färbungen an Bakterien sehr brauchbar ist.

Fixation von Bakterienausstrichen (Kultur, Gewebe u. s. w.) durch chemische Reagenzien.

I. Durch Lösungen.

Einlegen der Präparate in 1. Alcohol abs. (95—98%ig) für 10—15 Minuten oder 2. Alcohol abs. und Äther aa. 10—15 Minuten; 3. Methylalkohol 2—3 Minuten; 4. Aceton 5 Minuten; 5. konzentrierte wässrige Sublimatlösung; 6. Sublimatalkohol; 7. nach *Carpano* (bei Kapselfärbung) 5 Minuten in die Mischung: destilliertes Wasser 100 cm^3 , Quecksilberchlorid 4 g, Kaliumbichromat 3 g, Eisessig 2 cm^3 , dann sorgfältig waschen und auf einige Minuten einlegen in Jodalkohol.

II. Durch Dämpfe.

1. Osmiumsäure s. unten; 2. Formalindämpfe 5—10 Sekunden.

Die Fixation von Bakterienpräparaten durch Osmiumsäuredämpfe hat schon 1879 *Blanchard* empfohlen an Stelle der Hitze-fixation. *Blanchard* ließ aber die Dämpfe auf die trockenen Bakterien einwirken. *Malassez* stellte für Fixation von Knochenmark, *Jolly* für Blutfixation fest, daß ungleich schönere Bilder sich bei Verwendung nicht angetrockneter Objekte erzielen lassen. Bei beiden Autoren aber ergaben sich bei der Färbung Schwierigkeiten, offenbar infolge der zu langen Fixation. In der Bakteriologie hat das Verfahren dann vor allem seit *Weidenreich* Eingang gefunden.

Die Osmiumfixation kann man in einfacher Weise so vornehmen, daß man den Objektträger mit der Schicht nach unten für 3—4 Minuten auf ein weithalsiges Fläschchen legt, das mit Eisessig versehene Osmiumsäure enthält (z. B. 10 cm^3 einer 2%igen Osmiumsäurelösung mit Zusatz von 10 Tropfen Eisessig), dann an der Luft trocknet und sofort färbt. Um die Ausstriche vor der Osmiumfixation vor Trocknung zu schützen, hält man die Objektträger während des Ausstreichens über ein Gefäß mit warmem Wasser oder man haucht mehrmals auf das Präparat (*M. Carpano*).

Für Blutausstriche hat sich das Verfahren von *P. Argutinsky* bewährt: er empfiehlt die Deckgläser oder Objektträger vor dem Ausstreichen mit Osmiumsäuredämpfen mehrere Minuten anzuräuchern und sodann den noch feuchten Ausstrich $\frac{1}{2}$ Minute nachzuräuchern. Petrischale von 1 cm Höhe dient als Kammer, in welche man ein Uhrschälchen hineinstellt, das 6—10 Tropfen Osmiumessigsäure erhält: man gibt zu 2 cm^3 einer 4%igen wässrigen Osmiumsäurelösung 1 Tropfen 50%iger Essigsäure kurz vor Gebrauch.

Nach der Osmiumfixation läßt man trocknen und kann die Säure durch 5—10 Minuten langes Einwirken von Wasserstoffsuperoxydlösung (etwa 3%ig) entfernen. Darnach Einstellen des Präparates für $\frac{1}{4}$ Stunde in destilliertes Wasser, erneuert einmal und trocknet zwischen Fließpapier.

Fixierung nach *Weidenreich*.

Vorschlag von *H. Kayser*. Lösung I: 5 cm³ 1%ige Osmiumsäure *Merck* (Osmiumtetroxyd) und 10 Tropfen Eisessig.

Lösung II: eine sehr dünne wässrige Lösung von übermangansaurem Kali (1 kleines Krystall in 50 cm³ Wasser).

Ausführung. 1. Vorbehandlung des zum Ausstreichen dienenden Objektträgers: Einlegen für mindestens 2—3 Minuten in den Dampfraum. Dieser besteht aus einer Petrischale, auf deren Boden ein mit Lösung I versehenes und mit Drahtnetz zugedecktes Glasschälchen steht. Auf das Drahtnetz legt man die Deckgläschen oder Objektträger, mit der Seite nach unten, die zum Ausstreichen dienen soll. Schließen der Petrischale. 2. Das noch feuchte Gläschen wird mit dem Ausstrich versehen und sofort, noch feucht, in die Kammer auf das Drahtnetz mit der Schichtseite nach unten gegeben. Einwirkung der Dämpfe 2 bis 3 Minuten. 3. Darnach Präparat außerhalb der Schale lufttrocken werden lassen. Nicht erhitzen. 4. Übergießen mit Lösung II, nach einer Minute in Wasser spülen. Darnach Färbung.

Vereinfachung durch *Hamm*.

Hamm läßt 1. den Zusatz von Eisessig zur Osmiumtetroxydlösung fort, da die Affinität der Bakterien zu den basischen Anilinfarbstoffen an und für sich schon stark genug ist (Eisessig bedingt infolge Fällung der Nucleine und Nucleinsäure eine starke Kernfärbung!). 2. Hält *Hamm* das Abspülen des fixierten Präparates mit Kalium hypermanganicum für unnötig. 3. Hält er die Osmiumvorbehandlung nur dann für angezeigt, wenn das Untersuchungsmaterial (Blut) sofort auf die Glasfläche ausgestrichen wird, während bei den gewöhnlichen Bakterienpräparaten ja erst eine Verdünnung und Verteilung stattfindet.

Fig. 113.



Fixationsröhre nach *Hamm*.

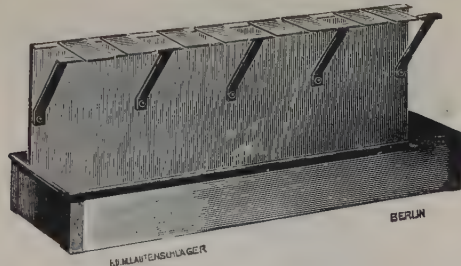
Hamm benutzt als Behälter für die Osmiumlösung, die zur größeren Haltbarkeit nicht eine rein wässrige Lösung von Osmiumtetroxyd, sondern eine Lösung in 1%iger Chromsäure ist, eine Glasröhre mit eingeschliffenem Glasstöpsel und abgesetzter Kuppe (Fig. 7). Letztere ist mit Glaswatte ausgefüllt und diese wird mit der Osmiumlösung imprägniert.

Die Fixationsvorschrift von *Hamm* lautet: 1. Einlegen des sauber gereinigten Glases in die Fixationsröhre 1—2 Minuten lang; 2. Herausnehmen und Belegen des Glases; 3. sofort das belegte Glas in die Fixationsröhre für 20, höchstens 40 Sekunden zurückbringen; 4. lufttrocken werden lassen, färben (ohne Flammenfixation).

IV. Die Färbung.

Von der Farbe tropft man soviel auf, daß Deckglas oder Objektträger schwappend bedeckt sind. Sonst bilden sich Farbtrocknungsränder mit schwer auswaschbaren Niederschlägen. Horizontalstellung

Fig. 114.



Farbgestell.

des Deckglases wird durch die Cornetpinzette ermöglicht, für Objektträger gibt es besondere Pinzetten (Fig. 111).

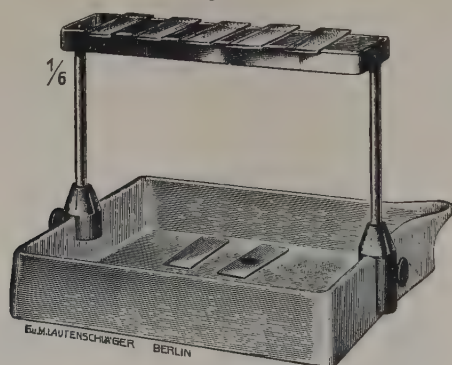
Hier sei auch auf die Färbegestelle (Fig. 114—118) aufmerksam gemacht. Anleitungen, nach denen man Färbegestelle improvisieren kann, sind zu finden in *Ficker*, Einfache Hilfsmittel zur Ausführung bakteriologischer Untersuchungen. Leipzig, C. Kabitzsch, 3. Aufl., 1921.

Auswahl des Farbstoffes.

1. Man muß unterscheiden, ob es sich um Ausstrichpräparate von Reinkulturen in den üblichen wässrigen Suspensionen oder um Ausstriche von Bouillonkulturen oder stark eiweißhaltigem Material (Gewebsausstriche, Blut, Eiter od. dgl.) handelt. Im ersteren Falle wird man diejenigen Farben bevorzugen, die am schnellsten und stärksten die Bakterien zur Darstellung bringen, im zweiten Falle muß man darauf Rücksicht nehmen, daß die schnell und stark wirkenden Farbstofflösungen meist auch zu den eiweißhaltigen Ausstrichelementen eine starke Affinität besitzen, so daß der Untergrund zu stark hervortritt. Das ist besonders der Fall bei den Fuchsin- und Violettlösungen, weniger bei Methylenblau. Deshalb ist Methylenblau besonders für Blut-, Eiter- u. s. w. Ausstriche geeignet. In manchen Fällen leistet eine Vorbehandlung der Präparate mit Jodlösungen und Alkohol gute Dienste zur Gewinnung niederschlagsfreier Präparate,

so ist es z. B. empfehlenswert, Präparate von Peptonwässern nach der Flammenfixation $\frac{1}{2}$ —1 Minute mit verdünnter Jodtinktur (1 Teil käufliche 10%ige Tinct. jod. und 9 Teile Alkohol, 96%ig) zu behandeln, Wasserspülen, darnach kurze Färbung ($\frac{1}{4}$ Minute) in verdünntem Carbolfuchsin (A. Böhme).

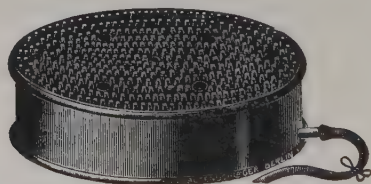
Fig. 115.



Farbgestell.

2. Die Auswahl der Farbe richtet sich auch nach der Art der Bakterien, die die Farbstoffe verschieden stark aufnehmen und festhalten: Kokken färbt man im allgemeinen lieber mit Methylenblau oder Violett als mit Fuchsin, hingegen ist Fuchsin namentlich in Form des verdünnten Carbolfuchsin die geeignetste Farbe für Vibrionen (Choleravibrionen im Stuhl und in Reinkultur, *Vibrio Metschnikoff* im

Fig. 116.



Färbplatte nach M. Neisser.

Organausstrich und in Reinkultur u. s. f.) Mit Fuchsin färbt man auch die Influenza ausstriche, ferner die Ausstriche von Rotlauf- und Mäusesepsisorganen, in allen diesen Fällen ist Methylenblau weniger am Platze.

3. Für die Auswahl des Farbstoffs kommt auch in Frage, ob es sich um Präparate handelt, die man möglichst lange konservieren will (Demonstrationspräparate u. s. f.). Erfahrungsgemäß lassen die Methylenblaupräparate am ehesten Abblässung erkennen, weniger die Violett-, und am wenigsten die Fuchsinpräparate.

Kontrastfärbungen für Ausstrichpräparate.

Kontrastfärbungen sind von Vorteil bei Ausstrichen von Geweben, Eiter, Blut u. s. f. Am meisten werden sie angewendet bei der Färbung von gonorrhöischem Eiter (s. S. 301), tuberkulösem Sputum (s. S. 310 ff.) u. s. w.

Die gebräuchlichsten sind:

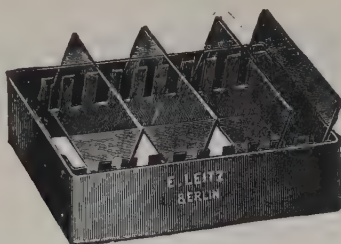
- I. Methylenblau-Eosin-Färbungen; entweder: 1. Vorfärben mit dünner wässriger Eosinlösung, bis Präparat rosa erscheint;
2. färben mit dünner Methylenblaulösung kurz;
3. Wasserspülen;

oder: färben in frischer Mischung beider Farbstoffe:

30 cm³ Löfflers Methylenblau und 10 cm³ gesättigter alkoholischer Eosinlösung. Hierin $\frac{1}{2}$ Minute färben.

Bakterien und Zellkerne blau, Protoplasma der Zellen rot. Brauchbar sind auch die käuflichen Mischungen: Giemsa, May-Grünwald, Abmann od. dgl.

Fig. 117.



Trockengestell nach E. Leitz.

II. Fuchsin-Methylenblau-Mischung nach *Pick* und *Jacobson* (s. S. 306).

III. Die Störung durch feinste, oft von kleinsten Bakterien nur schwer zu unterscheidende Niederschläge in Fuchsinpräparaten sucht *Frosch* durch eine Gegenfärbung mit Patentblau zu vermeiden, das sich zur Differenzierung für fuchsingefärbte Präparate gut eignet. Allerdings sind eine Reihe von Vorichtsmaßnahmen dabei anzuwenden. Die Ausstriche sind gleichmäßig dünn herzustellen.

1. Fixierung: Trocken oder feucht in absolutem Alkohol.
2. Färbung mit wässriger, nicht zu schwacher Verdünnung der alkoholischen FuchsinstammLösung, darauf sofort
3. abspülen in Patentblaulösung und in ihr belassen, bis das Präparat einen grünblauen Gesamtton angenommen hat.

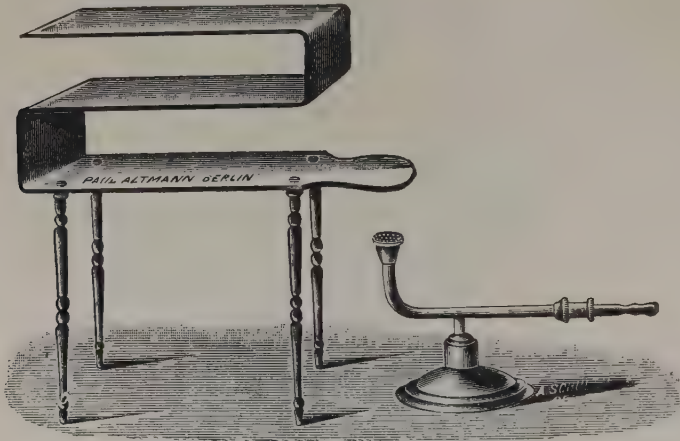
Farbherstellung: Patentblau (Höchst) in konzentrierter wässriger Lösung, jahrelang haltbar, wird in der Menge von 2—3 Tropfen mit 15—20 cm³ neutralen destillierten Wassers verdünnt, hierzu vor Ge-

brauch 1 oder 2 Tropfen Eisessig, Salz- oder Schwefelsäure. Dabei wird die blaue Lösung grün.

4. Abspülen in schwach saurem Wasser (1—2 Tropfen Eisessig auf 20—30 cm^3 destilliertes Wasser). Trocknen mit Fließpapier. Einschluß.

Bakterien und Kerne leuchtend rot, alles übrige blau bzw. grün. Rote Blutkörperchen hellgrün.

Fig. 118.



Heiztisch.

Die Methode versagt vor allem dann, wenn für die Herstellung der Patentblaulösungen das destillierte Wasser nicht neutral reagiert, es darf kein längere Zeit aufbewahrtes destilliertes Wasser hierfür benutzt werden. Auch lang aufbewahrte Ausstriche geben Mißerfolge.

V. Wasserspülung und Trocknung.

Die Wasserspülung zur Entfernung des Überschusses von Farbe erfolgt am besten unter dem dünnen Strahl der Wasserleitung. Trifft der Strahl die Schichtseite zu stark, so kann das Material weggeschwemmt werden. Ist man nicht sicher, daß das Material gut fixiert ist oder handelt es sich um schwer fixierbare Suspensionen (Bouillon- oder Peptonwasserkultur od. dgl.), so läßt man den Wasserstrahl lediglich auf die Rückseite des Präparates auftreffen, eine genügende Farbstoffentfernung tritt dann auch ein. Bei Überfärbungen (z. B. Carbofuchsin) empfiehlt Heim über das Präparat einen oder wenige Tropfen Alkohol mit dem Wasserstrahl gleichzeitig laufen zu lassen. Bei subtilen Färbungen (morphologische Studien u. s. f.) ist zu berücksichtigen, daß die verschiedenen Leitungswässer verschieden differenzieren können (Ficker) und daß Wasser aus Auslaufflaschen bei längerem Stehen Änderungen aufweist (Bakterienvegetationen, Alkaliabgabe vom Glas u. s. w.).

Anstatt durch Spülen unter der Leitung kann man auch durch leichtes Hin- und Herschwenken des Präparates in zwei Gläsern mit frischem Leitungswasser eine genügende Entfernung der Farbe erreichen.

Bei Arbeiten mit infektiösen Keimen wird man in Erwägung ziehen müssen, ob das angewandte Färbeverfahren die Keime auch abtötet oder ob nicht das Spülwasser noch entwicklungsfähige Infektionserreger enthalten kann.

Entfernung des Spülwassers. In der Regel trocknet man zwischen doppelt gefalteten Fließpapierstreifen. Dabei darf man zunächst nicht stark andrücken, sonst bleibt Kultur- und namentlich Gewebsmaterial (bei Organ-, Blut-, Eiter- u. s. w. -Ausstrichen) an dem Fließpapier kleben. Erst wenn durch ganz sanftes Andrücken die Hauptmenge des am Glas anhaftenden Wassers entfernt ist, darf man stärker darüber streichen. Vor Verlust von Material schützt man sich dadurch, daß man so verfährt wie nach der Geißelfärbung: man läßt das Wasser spontan ablaufen oder man schüttelt das überschüssige Wasser ab oder bläst es weg oder aber man saugt es vom Rande her mit Fließpapier ab. Schließlich ist ganz leichtes Erwärmen über der Flamme erlaubt. Wem das alles zu lang dauert, der kommt kürzer zum Ziele, wenn er nach Abschütteln der Hauptmenge des Wassers vorsichtig zwischen Fließpapier trocknet.

VI. Konservierung von Ausstrichpräparaten.

1. Ungefärbte Präparate.

Kann man die Ausstrichpräparate nicht sofort färben, so schlägt man sie nach Trocknung in Fließpapier ein und hält sie in einem gut verschlossenen Kästchen, sie bleiben dann einige Wochen, ja Monate lang färbbar, sofern der Aufbewahrungsraum nicht zu feucht ist. Im letzteren Falle (in den Tropen u. s. f.) bringt man die in Fließpapier eingeschlagenen Deckgläser oder Objektträger in Exsiccatoren, wozu jedes gut verschließbare Glasgefäß geeignet ist: man gibt Chlorcalcium in das Glas, legt eine Lage Watte darüber und gibt die Präparate hinein.

Eine Konservierung ungefärbter Präparate ist auch in Alkohol möglich. Man fixiert die feuchten Ausstriche durch vorsichtiges Übergießen mit Alkohol von 95—98% 10—30 Minuten lang, gießt den Alkohol ab und ersetzt ihn durch 80%igen, in welchem die Präparate bis zur Färbung aufbewahrt werden.

Die von *Giemsa* für die Konservierung von *Romanowsky*-Präparaten empfohlene Methode mit Paraffinöl ist auch für die Konservierung ungefärbter Bakterienpräparate brauchbar: man schlägt die getrockneten und fixierten Gläser in Fließpapier ein und legt sie in ein fest verschließbares Gefäß mit Paraffinöl. Will man färben, so entfernt man das Paraffin durch Abtupfen, mehrfaches Xylolbad, schließlich Entfernung des Xylols durch Alkohol, Alkohol trocknen, dann Farbe.

2. Konservierung gefärbter Präparate.

1. Die übliche Konservierung gefärbter Ausstrichpräparate erfolgt in der Weise, daß man die Präparate nach erfolgter Differenzierung (abspülen des Farbüberschusses durch Wasser) und Trocknung in Kanadabalsam einschließt. Ist das Präparat noch nicht genügend trocken, so entstehen mit dem Kanadabalsam Trübungen. Es empfiehlt sich daher, nicht nur zwischen Fließpapier zu trocknen, sondern das Präparat auch durch Hin- und Herschwenken in der Luft nachzutrocknen, man kann auch durch ganz leichtes Erwärmen über der Sparflamme des Bunsenbrenners oder in $\frac{1}{2}$ m Höhe über dem Vollbunsenbrenner die Trocknung vervollständigen.

Man darf nicht jeden beliebigen Kanadabalsam verwenden: durch die schlechteren Sorten wird die Farbe bald ausgezogen, die meisten Balsame besitzen saure Reaktion (Ameisensäure, Bernsteinsäure u. a.).

Will man die gewöhnlichen Handelsorten für die Konservierung benutzen, so erhitzt man und fügt etwas Kaliumcarbonat zu, filtriert durch Leinwand und dickt auf dem Sandbad soweit ein, daß der Balsam beim Erkalten spröde und glashart wird. Zum Lösen nimmt man reines Xylol, bis die gewünschte Konsistenz erreicht ist.

Lösung des Kanadabalsams erfolgt auch durch Chloroform oder Terpentinöl. Beide Lösungsmittel sind aber gegenüber gefärbten Präparaten weniger indifferent als Xylol. Balsam in Chloroform gelöst hat ein viel größeres Sättigungsbestreben für Sauerstoff als in Xylol gelöst (*Unna*).

Im Laboratorium bevorzugt man den auf Tuben gefüllten Kanadabalsam, in Gläsern pflegt er sich eher einzudicken.

2. Auch Zedernöl wird zur Konservierung von gefärbten Ausstrichpräparaten verwendet, man nimmt dann das eingedickte Zedernöl, während das gewöhnliche leichtflüssige das übliche Einschlußmittel darstellt, wenn man nicht konservieren will.

3. Glycerin, eignet sich als Einschlußmittel für mit Bismarckbraun gefärbte Präparate (*R. Koch*). Umrandung mit Asphaltlack.

4. Essigsäures Kali (1 Teil, 2 Teile Wasser), ebenfalls mit Asphaltlackumrahmung, konserviert nach *R. Koch* (a) fuchsin- und violettgefärbte Präparate.

5. Die einfachste Aufbewahrung gefärbter Objektträgerausstriche ist die ohne jedes Einschlußmittel: nach dem Trocknen läßt man das Präparat staubfrei und im Dunkeln (Mappen, Kästen) liegen. Besichtigung erfolgt ohne Auflegen von Deckgläsern, indem man direkt auf die gefärbte Schicht einen Tropfen Zedernöl gibt, das nach Absaugen und Abtupfen mit Fließpapier und schließlich mittels Xylols (Pinsel) entfernt wird.

6. Nimmt man die Besichtigung in Wasser vor (wobei die Bakterien größer erscheinen als in den zu Schrumpfungen führenden

Trockenpräparaten), so fixiert man das Deckglas auf dem Objektträger an den vier Ecken oder an der oberen und unteren Kante durch Wachs oder Paraffin. Will man nach der Wasserverdunstung das Präparat abermals besichtigen, so läßt man vom Deckglasrande her einen Tropfen Wasser zwischen Deckglas und Objektträger laufen.

Besondere Färbemethoden.

1. Gramsche Färbung.

Empfehlenswerte Fassung.

1. Färbung mit Anilinwassergentianaviolett, kalt, 2 Minuten (Herstellung der Farbe s. S. 273). Ohne abzuspülen aber nach Ablauflassen:

2. 2 Minuten in *Lugolsche* Lösung (Jod 1·0, Jodkalium 2·0, dazu zunächst nur 10 cm³ Aqua dest., nach Lösung noch 290 cm³ Aqua dest. hinzufügen). Ohne abzuspülen, aber nach Ablauflassen.

3. Entfärben in Alcohol abs. unter Bewegen des Präparates und Alkoholerneuerung (bzw. Übertragen in ein zweites Schälchen mit Alcohol) $\frac{1}{2}$ Minute.

Falls es sich um ein Reinkulturpräparat einer grampositiven Bakterienart handelt:

4 a) sofort trocknen zwischen Fließpapier, Einschluß in Öl oder Balsam.

Falls eine Mischung von grampositiven und gramnegativen Bakterien oder eine Reinkultur gramnegativer Bakterien vorliegt:

b) nachfärben mit Carbolfuchsin 1:20, 2—3 Minuten.

5. Wasserspülen, trocknen, Einschluß.

Falls es sich nicht um Gegenfärbung von Bakterien, sondern um Gewebsausstriche handelt:

4 c) nachfärben mit Eosin (Safranin oder Carmin).

5. Wasserspülen, trocknen, Einschluß.

Unter verschiedenen Bedingungen zeigt die *Gramsche* Färbemethode Abweichungen.

Gehen wir den einzelnen Phasen der Präparatherstellung und Färbung nach, so ist für vergleichende Untersuchungen zunächst die Beschaffenheit der Kultur von Bedeutung. Nicht in jedem Vegetationsstadium und nicht auf jedem beliebigen Nährboden ist bei empfindlicheren Bakterienarten der gleiche Farbeffekt zu erwarten: das Alter der Kultur und innerhalb der gleichen Kultur wieder die Entnahmestellen sind von Belang: im oberen Teil eines Agarstrichröhrchens kommt es eher zu Trocknungserscheinungen wie unten, bei dicken Kulturrasen stehen die nach oben geschobenen Vegetationen unter anderen Bedingungen als die untersten, den Nährboden direkt berührenden Generationen. Zu warnen ist vor einem zu dicken

Auftragen auf Deckglas oder Objektträger: unzerteilte Klumpen von Bakterien bedingen ein sehr starkes Niederschlagen von Farbstoff; hier muß der Alkohol länger zur Entfärbung einwirken als bei den isoliert liegenden Individuen.

Nach *Neides* vergleichenden Untersuchungen vermindert länger dauerndes starkes Erhitzen die Entfärbungszeit, wie ja auch lufttrocken aufbewahrte Ausstriche sich im allgemeinen in kürzerer Zeit entfärben als frisch hergestellte. *Neide* bevorzugte daher für die Fixation die von *Arthur Meyer* für die Geißelfärbung vorgeschlagene Methode, und erwärmte den Ausstrich (lufttrocken) 5 Minuten auf dem Trockenbade bei 40°. Allgemein kann man aber dieses Vorgehen nicht empfehlen, die Temperatur ist zur Erzielung genügender Fixation zu niedrig, auch besteht kein Grund von dem dreimaligen Durchziehen des Deckglases durch die Flamme unter praktischen Verhältnissen abzugehen.

Sehr viele Ungleichmäßigkeiten der *Gram*-Färbungen ergeben sich aus der Verschiedenheit der im Handel befindlichen *Gentianaviolett*sorten. Aus diesem Grunde hatte schon 1888 *Unna* (a) in einer wichtigen Arbeit über die *Gram*-Färbung (für Schnitte) das Viktoriablau, ein methyliertes Naphtholderivat des Pararosanilins empfohlen. Nach *Löfflers* vergleichenden Untersuchungen werden die besten Färbungen mit Methylviolett 6 B und Methylviolett BN erzielt. Diese Farben sind in 1—2½% igem Carbolwasser (im Verhältnis von 1:10) zu lösen. Die Carbolsäurelösung ist immer frisch herzustellen. Vergleichende Versuche, ob auch in Anilinwassermischungen für Ausstrichpräparate diese Farben zu bevorzugen sind, stehen noch aus, doch ist es anzunehmen. *Neide* bevorzugt Methylviolett BB der Höchster Farbwerke. Von anderen Seiten wird Krystallviolett (in 0.1—0.5% iger wässriger Lösung) an Stelle des Anilinwassergentianavioletts empfohlen.

Die meisten Abänderungsvorschläge für die *Grams*che Färbung suchen die schlecht haltbare Anilinwasserfarblösung zu ersetzen, so *E. Fränkel*, *Löffler* (s. oben), *Kutscher*, *Nicolle* u. s. w.

E. Fränkel nahm statt des Anilinwassers ein 2½% iges Carbolwasser.

Kutscher stellt eine haltbare Farblösung wie folgt her: filtriertes gesättigtes Anilinwasser, 5% ige Carbolsäure und absoluten Alkohol zu gleichen Teilen, hierzu Gentianaviolett in Substanz im Überschuß. Ein Uhrschildchen mit destilliertem Wasser erhält etwa 15—20 Tropfen der Farbstoff-Stammlösung (so viel, bis sich an der Oberfläche ein schillerndes Häutchen zu bilden beginnt).

1. Hierin Färbung der Deckglasausstriche 10—15 Minuten kalt oder 1—5 Minuten unter mäßiger Erwärmung;

2. abspülen mit destilliertem Wasser;

3. 1 Minute Jodjodkalium;

4. Entfärbung in absolutem Alkohol.

Nicolle empfiehlt Carbolgentianaviolett, s. S. 274.

Jensen verwendet wässriges Methylviolett ohne Beize (Anilin, Carbol) s. S. 303.

Bisher ist ein vollwertiger Ersatz für eine frisch bereitete Anilinwassergentianaviolettlösung bei der *Gramschen* Färbung aber noch nicht gefunden. So bestehend es z. B. ist, das haltbare Carbolgentianaviolett zu benutzen, eine absolute Gewähr für die Identität der Wirkung wie bei der Anilinwasserfarblösung ist nicht in jedem Falle gegeben.

Nimmt man wie es vielfach geschieht, bei der *Gramschen* Methode die Erwärmung der Farblösung zu Hilfe, so bekommt man ganz andere Resultate, ebenso wie bei Verlängerung der Färbedauer; in beiden Fällen ist das Festhalten des Farbstoffes ein viel zäheres. Das gleiche gilt von der Verlängerung der Wirkung des Jodjodkaliums.

Ich verwerfe grundsätzlich das Erwärmen: sowohl bei Erwärmen mit der Farblösung als mit dem Jodjodkalium bringt man Momente in diese Differenzierungsmethode herein, die bei der Unterschiedlichkeit dessen, was Erwärmen heißt, bei der Färbung empfindlicher Mikroorganismen notwendig zu einer Unsicherheit in der Beurteilung führen müssen. Es ist selbstverständlich, daß bei der Färbung ganz sicher grampositiver Keime jeder freie Hand hat, durch Erwärmen das Verfahren abzukürzen oder die Färbung zu verstärken, so daß dann auch bei der Entfärbung nicht so rigorose Grundsätze zu gelten haben; aber sobald diagnostische Fragen im Spiele sind, sollte man sich peinlich genau an eine ganz bestimmte Vorschrift halten. Die kleine Mühe, sich immer Anilinwassergentianaviolett frisch herzustellen, wird doch aufgewogen durch die Sicherheit bei der Beurteilung des Färberesultats.

Von manchen Seiten wird Verstärkung der Jodlösung empfohlen, so von *Nicolle* (s. unten) 1:2:200, *Czaplewski* 1:3:200, *Jensen* 1:2:100 u. s. w.

Auch die Beschaffenheit des Alkohols ist für den Ausfall der *Gram-Färbung* nicht gleichgültig. *Gram* selbst empfahl absoluten Alkohol. Nimmt man verdünnten oder wird der absolute Alkohol durch die mitübertragene Farblösung verdünnt, so findet schnellere Entfärbung statt als im absoluten. *Neide* nahm bei seinen vergleichenden Untersuchungen den 80%igen. *Jensen* nimmt mindestens 99%igen Alkohol. *C. Günther* nahm an, daß in absolutem Alkohol auch bei längerem Verweilen eine weitere Entfärbung nicht stattfindet. Das trifft für bestimmte Schnittfärbungen gewiß zu. Für Ausstrichpräparate aber gilt es nicht.

Kißkalt prüfte die verschiedenen Alkohole auf ihre entfärbende Wirkung bei gefärbten und mit Jodjodkalium vorbehandelten Präparaten und kam zu dieser Reihenfolge: Methyl-Äthyl-Propyl-Butyl-Amylalkohol. Methylalkohol entfärbt am stärksten, selbst einige Bakterienarten, die sonst grampositiv sind. Amylalkohol entfärbt am schwächsten, er läßt sogar Typhus- und Coli noch gefärbt.

Die *Günthersche* Abänderung der *Gramschen* Färbung (entfärben kurz in 3%igem salzsauren Alkohol) empfiehlt sich nur für dickere Ausstriche, auch da muß man die Säure sehr sorgfältig auswaschen, sonst können leicht auch grampositive Bakterien entfärbt werden und die Gegenfarbe annehmen. Übrigens hat *Günther* selbst für Ausstrichpräparate nur Alkoholentfärbung vorgeschlagen.

Für die Kontrastfärbung bei der *Gramschen* Methode kommt in Frage, ob man lediglich Gewebe, Eiterzellen u. s. f., oder Bakterien gegenfärben will. Im ersteren Falle ist Eosin sehr brauchbar, auch Safranin (wässrig-alkoholische Lösung) oder Pikrocarmin, letzteres auch zur Vorfärbung empfehlenswert (*Günther*). Für die Bakteriennachfärbung ist das oben vorgeschlagene dünne Fuchsin am empfehlenswertesten, auch mit Vesuvín kommen, wenn auch weniger deutlich, die gramnegativen Bakterien zur Darstellung. Vgl. auch S. 302.

Nicollesche Abänderung der *Gram-Methode*.

Verwendung von Carbolgentianaviolett, jodieren mit verstärkter Jodlösung, entfärben mit Acetonalkohol.

1. 1—5 Minuten färben unter Erwärmen mit Carbolgentianaviolett (10·0 gesättigte alkoholische Gentianaviolettlösung, 100·0 1%iges Carbolwasser);

2. 4—6 Sekunden in mehrfach erneuertem Jodjodkalium (Jod 1·0, Jodkalium 2·0, Aqua dest. 200·0);

3. entfärben in Alcohol abs. 3 Teile und Aceton 1 Teil.

Diese Entfärbung ist meist zu energisch, so daß bei Nachfärbungen auch violett gebliebene Bakterien die Kontrastfarbe annehmen können. Man muß daher auf die Gegenfärbung verzichten.

Eine Änderung der *Gramschen* Methode in zweifacher Hinsicht führte *Claudius* ein: an Stelle der Jodbeize benutzte er Pikrinsäure, an Stelle des Alkohols zur Feststellung der entstehenden Farbechtheit verwendete er Chloroform (oder Nelkenöl).

Methode nach *Claudius*.

1. Färben in 1%iger wässriger Methylviolettlösung (Methylviolett 6 B extra [*Merck*]) 1 Minute; 2. abspülen mit Wasser, trocknen mit Fließpapier; 3. abspülen in gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung und Aqua dest. aa.; 4. abspülen in Wasser, trocknen mit Fließpapier; 5. abspülen in Chloroform oder Nelkenöl, bis das Präparat ungefärbt erscheint (bei Gewebsausstrichen. Bei Reinkulturausstrichen bleibt der Grundton natürlich blau); 6. trocknen, Balsam. Bakterien blau, falls grampositiv. Pikrinsäure wirkt wie Jodjodkalium. Gewebe farblos bis gelblich. Empfehlenswert sind Vorfärbungen mit Carminlösung.

Eisenberg schlägt vor: 1. Färben der fixierten Ausstriche mit 1%iger wässriger Lösung von Viktoriablau B 3—5 Minuten; 2. Wasser-

spülen; 3. *Lugolsche* Lösung 1—2 Minuten; 4. Acetonalkohol nach *Nicolle*, bis keine Farbe mehr ausgeht; 5. Gegenfärbung mit verdünntem Carbolfuchsin (1 : 10); 6. Wasserspülen, trocknen, Einschluß.

Verlängerte *Gram*-Färbung zur Differentialdiagnose von Diphtherie- und Pseudodiphtheriebacillen nach *H. Langer* und *H. Krüger*:

1. Anilinwassergentianaviolett 2 Minuten; 2. *Lugolsche* Lösung 5 Minuten; 3. absoluter Alkohol 15 Minuten; 4. dünne Fuchsinlösung* 1 Sekunde. Diphtheriebacillen rot, Pseudodiphtheriebacillen blau.

Statt Gentianaviolett nimmt *Langer* neuerdings Brillantgrün, Herstellung der Lösung wie bei Anilinwassergentianaviolett, jedoch mit Zusatz von Alkohol bis zur eintretenden Lösung (Anilinwasserbrillantgrün ist mindestens 2 Monate bei Zimmertemperatur haltbar).

Über Abänderungen des *Gram*-Verfahrens bei Tuberkelbacillen (*Much* u. s. f.) s. S. 321 bei Gonokokken (S. 302).

2. Methoden der Strukturfärbung.

a) Ektoplasma.

I. Die Darstellung der Membran gelang an *Bac. cohaerens* (alte Kultur) *Grimme* in der Weise, daß er das Präparat nach *Gram* färbte, dann Fuchsinlösung 1 : 10 seitlich zulaufen ließ. Nach kurzer Einwirkung nachspülen mit Wasser, schnell trocknen, Balsam.

II. *Eisenbergs* (c, d) Modifikation der Methode von *Claudius* zur Darstellung des Ektoplasmas: 1. Fixieren wie gewöhnlich; 2. 1—2 Minuten färben mit 1% iger wässriger Methylviolettlösung (Methylviolett B Grüber); 3. 1—2 Minuten behandeln mit halbkonzentrierter wässriger Pikrinsäurelösung; 4. trocknen mit Fließpapier und an Luft; 5. ca. 1 Minute lang mit 2—3mal erneutem Chloroform entfärben; 6. eventuell nachfärben mit starker wässriger Eosinlösung (Eosin wasserlöslich) oder 10fach verdünnter Carbolfuchsinlösung. Zur Vermeidung von Niederschlägen bei letzterer Nachfärbung spült man das getrocknete Präparat ganz kurz nochmals mit Chloroform ab. Nur anwendbar auf grampositive Bakterien.

Eisenbergs Modifikation der *Löwitschen* Methode.

Die von *Löwit* angegebene Methode zur Darstellung der Erythrocytenmembran wandte *Eisenberg* für Bakterien an, er fand Säurefuchsin und Orange G unverwendbar, hingegen bewährte sich Aurantia.

1. Fixierung und Vorfärbung des lufttrockenen Präparates mit einer konzentrierten methylalkoholischen Aurantialösung (*Grüber*) 1 Minute lang. Abgießen; 2. Wasserspülen; 3. 1 Minute färben mit

* Herstellung wird nicht angegeben.

0·5% iger wässriger Lösung von Methylviolett B (*Grübler*); 4. Wasserspülen, trocknen. Ebenfalls nur anwendbar für grampositive Bakterien, bei gramnegativen Bakterien nur für ganz junge Kulturen.

III. Für die Darstellung der „Schleimschichten“ bei solchen Bakterien, die wir für gewöhnlich nicht zu den Kapselbakterien rechnen, gibt es eine Universalmethode nicht, die einzelnen Bakterien verhalten sich da verschieden, wie auch die mikrochemischen Prüfungen kein einheitliches Ergebnis liefern (Zusammenstellung dieser Methoden bei *A. Meyer*, S. 177). Färbungen der Schleimschicht bei *B. asterosporus* gelangen *A. Meyer* mit einer mäßig konzentrierten Methylviolettlösung in 30% igem Alkohol und mit einer gleichen Lösung von Magdalarot nach einigen Stunden. Beobachtung in Glycerin.

IV. Kapselfärbung s. S. 341.

b) Geißelfärbung s. S. 329.

c) Endoplasma.

1. Sporenfärbung s. S. 350.

2. Granula.

Färbung von Protoplasmaeinschlüssen.

Schon frühzeitig fielen in Bakterienzelleibern Körnchen auf, die mit sehr einfachen Methoden zur Darstellung kamen, weil sie eine starke Affinität zu Farbstoffen besitzen. Sie wurden als metachromatische Körnchen (*Babes*) oder als *Babes-Ernstsche* Körperchen, später auch als Polkörner bezeichnet. Andererseits beobachtete man mit Methoden, die sich an die Tuberkelbacillen- oder Sporenfärbung anlehnten, Einschlüsse, die der Entfärbung mit Säuren einen beträchtlichen Widerstand entgensetzten (sporogene Körnchen).

Babes (*a*) ließ *Löfflers* Blau $\frac{1}{4}$ Stunde lang auf die Bakterien einwirken, dann leichtes Abwaschen, Untersuchen in Wasser oder Balsam. *Ernst* (*a, b*) fixierte in der Flamme, färbte mit *Löfflers* Blau $\frac{1}{2}$ Minute unter Erwärmen bis leichte Nebel aufsteigen. Gründlich Wasserspülen, dann 1—2 Minuten Bismarckbraun.

Albert Neisser (*a*) empfahl 2 Methoden:

I. Färben in erwärmtem Carbofuchsin, kurz abspülen in 1% iger wässriger Schwefelsäure, nachfärben in wässrigem Methylenblau.

II. Färben in erwärmter *Ehrlichscher* Anilinwasser-Methylviolettlösung, kurz abspülen in 1% iger wässriger Schwefelsäure, nachfärben in Säurebraun (G extra).

In einer späteren Arbeit berichtet *Ernst* über erfolgreiche Färbung mit *Delafields* Hämatoxylin in konzentrierter Lösung, 5 Minuten lang (Körnchen intensiv schwarzviolett, Bacillen fast ungefärbt oder schwach lila). Nachfärbung mit Vesuvium. Auch mit Kernschwarz gelang die Färbung. *Ernst* hielt sie für Kerne.

Schon *Ernst* betonte, daß mit den verschiedenen Methoden Verschiedenes zur Darstellung kam, und *Bunge* zeigte, daß die *Babes-Ernst*-schen Körperchen, die sich mit kochender Methylenblaulösung auflösen, Sporenvorläufern nicht entsprechen, denn letztere nehmen diese heiße Farbe an. Seitdem haben sich zahlreiche Arbeiten damit befaßt, Bakterienkörnchen (Granula) darzustellen. In der medizinischen Bakteriologie hat die Körnchenfärbung eine praktische Bedeutung zur Unterscheidung von Diphtherie- und Pseudodiphtheriebacillen gewonnen. Da kam es den Autoren weniger darauf an, das Wesen dieser Körnchen zu ergründen, als vielmehr eine Färbemethode ausfindig zu machen, die in wenigen Minuten diesem praktischen Zwecke diene. Im folgenden sollen zunächst diese Methoden aufgezählt werden. Zum wissenschaftlichen Studium der Frage der Einschlüsse, die eine sehr verwickelte ist, sind diese Methoden weniger geeignet. Unter dem Namen Körnchen ist eben sehr Verschiedenes dargestellt worden. Hierüber orientieren eingehend die Arbeiten von *Grimme* und *A. Meyer*, in denen eine Analyse der als Körnchen bezeichneten Gebilde erfolgt. Diese Autoren bezeichnen die Körnchen, die wir zur Identifizierung bei Diphtherie darstellen, als *Volutinkörner*, die am typischsten bei *Spirillum volutans* darzustellen sind, es sind wahrscheinlich eiweißartige Reservestoffe, die durch eine Anzahl mikrochemischer Reaktionen differenzierbar sind.

1. Färbung der Polkörnchen oder Babes-Ernstschen Körperchen der Diphtheriebacillen.

Die drei empfehlenswertesten Methoden (*M. Neisser*, *Gins*, *Ljubinski*) seien vorangestellt:

1. Methode nach *M. Neisser*.

Reagenzien: 1. Lösung *A*. Methylenblau (pulverförmig, Methyl. medic. Höchst 1·0, Alcohol abs. (96%ig) 20·0, dazu Aqua dest. 950·0, Acid. acet. glac. 50·0.

Lösung *B*. Krystallviolett Höchst 1·0, Alcohol abs. 10·0, Aqua dest. 300·0.

2. Chrysoidin 2 g in 300 Aqua ferv. gelöst und filtriert.

Ausführung: 1. Nach Fixation färben in einer Mischung von 2 Teilen Lösung *A* und 1 Teil Lösung *B* 1—2 Sekunden; 2. abspülen mit Wasser, sofort 3. nachfärben mit Chrysoidin 1—2 Sekunden; 4. abspülen mit Wasser. Färbung (1) und Gegenfärbung (3) dürfen bis 15 Sekunden ausgedehnt werden.

Protoplasma der Diphtheriebacillen gelb bis braun, Körnchen dunkelblau. In der Regel zeigt jeder Diphtheriebacillus an jedem Pole ein Körnchen, mitunter nur an einem Pole eines. Zuweilen findet sich auch ein mittleres Körnchen. Pseudodiphtheriebacillen zeigen keine

oder nur sehr vereinzelte und ungleichmäßig große Körnchen. Die Kulturen sind auf mit Rinderserum hergestelltem *Löffler*-Serum bei 35° zu züchten und sollen ein Alter von 9—20 Stunden haben.

Scheller empfiehlt, beide Lösungen 15—20 Sekunden lang einwirken zu lassen.

2. Die *Ginssche* Modifikation der *M. Neisserschen* Färbung (*Gins, b*) lehnt sich an die Methode von *Coles* (s. unten) an. Empfohlen für Originalausstrichpräparate aus dem diphtherieverdächtigen Material.

1. Färbung mit *Neisser I* (Essigsäure-Methylenblau + Krystallviolett) einige Sekunden; 2. abspülen mit fließendem Wasser; 3. Behandlung mit *Lugolscher* Lösung, die auf 100 Teile 1 Teil konzentrierter Milchsäure enthält, 3—5 Sekunden; 4. gut abspülen; 5. nachfärben mit *Chrysoidin* einige Sekunden; 6. abspülen, trocknen.

Wirkt die Jodlösung zu lange ein, so erscheinen die Bacillen unförmig aufgetrieben. Nach der Jodbehandlung ist sorgfältiges Wasserspülen anzuraten, da *Chrysoidin* mit den Jodresten schwarze Niederschläge bildet.

Die Methode hat den Vorteil, daß die äußere Form des *Diphtheriebacillus* deutlicher hervortritt, als bei der gewöhnlichen Doppelfärbung. Die Körner selbst erscheinen größer und intensiver gefärbt.

Leptothrix buccalis kann zu Täuschungen Anlaß geben, sofern sie nur in kürzeren Exemplaren vorhanden ist, auch ist bei diesen die Lagerung der Körner nicht immer polar, im Gegensatz zu den *Diphtheriebacillen*.

3. *Ljubinski* färbt $\frac{1}{2}$ —2 Minuten in einer Lösung von *Pyoktanin* (*Merck*) 0·25, *Acid. acetic.* (5%ig) 100·0, dann abspülen mit Wasser. Nachfärben mit *Vesuvium* 1 : 1000 $\frac{1}{2}$ Minute, Körnchen schwarzblau und groß. Stäbchen deutlich konturiert. Die Methode wird gerühmt.

Blumenthal und *Lipskerow* folgen derselben Methode. Nachfärbung mit *Chrysoidin* 1 : 330.

Verfahren nach *Coles*. Einschalten von *Lugolscher* Lösung zwischen erster und zweiter Färbung nach *Neisser*.

1. *Neissersche* Mischung I 10—30 Sekunden; 2. Wasserspülen; 3. Jodjodkalium 10—30 Sekunden; 4. Wasserspülen; 5. *Neissersche* Lösung II 10—30 Sekunden.

Auch *Epstein (b)* benutzt die *Lugollösung*: 1 *a*) Färben 30 Sekunden in *Löfflers* Methylenblau oder *b*) *Pyronin* 1%ig ebensolange; 2. abspülen mit Wasser; 3. *Lugol* 10 Sekunden; 4. spülen.

Körner bei *a* grünlich-schwarz, Bacillen grünlich, bei *b* Körner dunkelrot, Bacillen hellrot.

Beauverie fixiert in Alkohol, färbt 2—3 Minuten mit wässerigem oder *Löfflerschem* Methylenblau, wäscht ab, behandelt dann 2—3 Minuten mit *Lugol*, abwaschen, nachfärben mit 1%iger wässriger *Eosinlösung*. Die Methode bietet keine Vorteile.

Verfahren von Piorkowski: 1. 1—2 Minuten färben unter starkem Erhitzen in Löfflers Methylenblau; 2. 1 Sekunde in 3%igem Salzsäurealkohol; 3. abspülen mit Wasser; 4. 10 Sekunden nachfärben in 1%iger wässriger Eosinlösung. Die Methode wird ungünstig beurteilt (Umrisse der Stäbchen undeutlich, Körner klein und nicht scharf umgrenzt).

Dies Verfahren änderte *De Rovaart* dahin ab, daß er nach 1 mit Wasser abspült, darnach 1—1½ Minuten mit Vesuvín 1‰ig nachfärbt. Dadurch ist die Methode verbessert, aber ein Vorteil vor der *Neisser*-schen ist nicht zu erkennen.

W. Peck färbt 3—4 Sekunden mit Löfflers Methylenblau, spült mit Wasser ab, Nachfärbung ½ Minute mit Vesuvín 2‰ig. Das Verfahren bietet keine Vorteile.

Falières änderte die *Neisser*sche Färbung dahin ab, daß er den Eisessig durch Borax ersetzte: 1. Färben in Methylenblau 2·0, Borax 0·5, Aqua dest. 100·0, Alcohol abs. 8 Tropfen; 2. Wasserspülen; 3. nachfärben ½ Minute in Vesuvín 1 : 1000. Polkörner dunkelblau, Bacillenleiber hellbraun. Die Methode konkurriert mit der *Neisser*schen; Körnchen sowie Bacillen heben sich gut ab.

Löfflers Körnchenfärbung (d): 1. Fixation durch leichtes Erwärmen; 2. färben ohne Erwärmen 10 Sekunden lang mit der Lösung: Borax (2·5%), Methylenblau (1%) 4 Teile, polychromes Methylenblau (*Grübler*) 1 Teil, Bromeosin extra A G (Höchst) (0·05%ig) 5 Teile; 3. abspülen mit Wasser; 4. entfärben mit Tropäolin 00 0·01 gelöst in Essigsäure (0·25%ig), 500·0 Bismarckbraun 1·0 gelöst in Alcohol abs. 500·0 10 Sekunden lang; 5. abspülen mit Wasser. Körnchen erscheinen schwarz.

Oder Entfärben durch Eintauchen in: Tropäolin 00 (konzentrierte wässrige Lösung) 5 Teile, Essigsäure 0·5, Wasser 100·0. Will man langsamer entfärben, so verdünne man die Tropäolin-Essigsäure auf das 5—10fache mit destilliertem Wasser.

Methode von Trincas (a): 1. Färben 1 Minute in Toluidinblau 0·25, Eisessig 2·0, Alcohol abs. 5·0, Aqua dest. 100·0; 2. ohne Waschen gegenfärben 1 Minute in wässriger 1%iger Vesuvínlösung. Körnchen dunkelviolet, Bacillen grünlich gelb.

Sommerfeld: 1. Übergießen des fixierten Präparates mit Methylenblau (*Löffler*, alkoholisches oder wässriges); 2. abspülen mit Wasser oder trocknen mit Fließpapier; 3. behandeln mit Formalinalkohol (gleiche Teile Formalin und Alcohol) bis blaue Farbe gelöst und Präparat fast farblos erscheint (einige Sekunden); 4. abspülen mit Wasser, trocknen. Gegenfärbung überflüssig aber möglich (Vesuvín od. dgl.).

Tribondeau und *Dubreuil* fixieren in Alcohol, Färbung in Carbolkrystallviolet, Nachfärbung mit Vesuvín.

Verfahren von Pitfield: A. Argent. nitric. 5·0, Aqua dest. 5·0, Ges. alc. Fuchsin 3 cm³; B. Acid. pyrogall. 1·0, 10%ige Natron-

lauge 5·0, Aqua dest. 10·0; *C.* Carbofuchsin 10 Tropfen, Aqua dest. 10 cm³.
 1. Präparat mit *A* bis zum Kochen erhitzen; 2. abspülen mit Wasser;
 3. mit Lösung *B* bis Kochen erhitzen; 4. aufgießen von *C*, 2 Minuten färben; 5. abspülen mit Wasser, trocknen. Körner schwarz, Bacillenleiber rot.

Einzeitige Methoden (Färbung in Farbmischungen).

Schauffter: 1 Minute färben mit einer Mischung von *Löffler*-schem Methylenblau, Pyronin und salzsaurem Alkohol, nämlich: filtriertes *Löfflersches* Methylenblau 10·0, filtrierte 5%ige Lösung von Pyronin (*Grübler*) 1·5, Salzsäure (25%ig) 3·0 in 97·0 absolutem Alkohol 5·0. Körnchen rot, Bacillen blau. Die Färbung fällt sehr ungleichmäßig aus. Oft sind die Stäbchen rot gefärbt und die Granula undeutlich.

M. Rasikin: Farbmischung (haltbar): Ac. acetic. glac. 5·0, Aqua dest. 95·0, 95%iger Alkohol 100·0. Alte gesättigte wässrige Methylenblaulösung 4·0, *Ziehls* Carbofuchsin 4·0.

Ausführung: Farbmischung in dünner Schicht auf Präparat auftropfen, Präparat über die Flamme ziehen, wodurch der in der Mischung enthaltene Alkohol aufflammt und abbrennt (geschieht nach 8—10 Sekunden). Nach weiteren 5—6 Sekunden in Wasser abspülen, trocknen. Körnchen tiefblau, Stäbchen hellrot.

Methode von *Crouch*: Das fixierte Präparat 1—2 Sekunden färben in folgender Farbmischung: 1%ige Lösung von Methylgrün 5 Teile, 1%ige Lösung von Dahlia 1 Teil, Wasser 4 Teile. Diese Methode wird ungünstig beurteilt, es fehlt der Kontrast, auch sind die Körner undeutlich.

Methode von *Roux*: 2 Minuten lang kalt färben in einer Mischung von Dahliaviolett 1·0, Alkohol (90%ig) 10·0, Aqua dest. ad 100·0 und Methylgrün 1·0, Alkohol (90%ig) 10·0, Aqua dest. ad 100·0. Polkörner rötlich-violett, Bacillenleib grünlich.

Auch *Bronstein* benutzt Dahlia, das nach *Roux* zu den Körnern eine größere Affinität haben soll als Methylenblau.

3. Färbung des Volutins.

Zur Charakterisierung des Volutins diene folgendes: Die Volutinsubstanz ist in Wasser löslich, u. zw. geben nach *A. Grimme* die Bakterien in kaltem Wasser das Volutin in 2—3 Tagen ab, bei 80° während 5 Minuten. *Ficker* kochte die mit Diphtheriebacillen beladenen Deckgläser $\frac{1}{4}$ Minute in destilliertem Wasser, ohne daß eine Schädigung der Körnchen eintrat, nach $\frac{1}{2}$ Minute langem Kochen ließen sie sich nicht mehr darstellen. Nach *Grimme* ist das Volutin unlöslich in kon-

zentrierter Pikrinsäurelösung, Alkohol, Chloroform, Äther, nach *Ficker* in Xylol. Chloralhydrat (5 Chloralhydrat und 2 Wasser, *Grimme*) löst es langsam. Nach *Ficker* schädigt schon 0.1% KOH, *Grimme* sah völlige Lösung in 5%iger Natriumcarbonat- oder Ätzkalilösung in 5 Minuten. Nach *Ficker* keine Färbung in Sudan III, keine Begünstigung der Darstellung bei Behandlung mit Jodjodkali, Tannin, Brechweinstein, Formalin, Carbolsäure. Weitere Merkmale s. *A. Grimme* sowie *A. Meyer*.

Zur Fixation des Volutins eignen sich nach *Grimme* Formaldehyd, Osmiumsäure, Alkohol. Da die Diphtheriekörnchen nach *Grimme* und *A. Meyer* mit den Volutanskugeln identisch sind, so folgt daraus, daß wenigstens für diese Bakterienart eine andere Fixationsmethode als die übliche Flammenfixation nicht nötig ist. *Beauverie* verwirft auch für Diphtheriekörnchen die Hitzefixation und nimmt Alkohol, Alkoholoessigsäure, Sublimat oder Formol. *Ficker* erhielt die schönsten Körnchenpräparate mit der Durchsaugmethode ohne jede Fixation. Auch *Grimme* fixierte nicht in der Flamme, gibt aber an, daß ein dreimaliges Durchdie-Flamme-ziehen ohne Einfluß war.

Färbung. *Grimme* färbte die ausgestrichenen und trockenen Präparate mit Methylenblau 1 + 10 (1 Teil gesättigte alkoholische [95%ige] Lösung und 10 Teile Wasser) 2—5 Minuten, Wasserspülen, untersuchen in Wasser.

Diese Methode eignet sich gewiß für das von *Grimme* vorzugsweise benutzte *Spirillum volutans* und einige andere Bakterienarten, bei anderen Arten (Diphtherie) macht sich eine Verfeinerung der Methode nötig. Es ist darauf aufmerksam zu machen, daß sich nicht nur die einzelnen Bakterienarten, sondern auch die einzelnen Stämme derselben Art verschieden verhalten. So konnte *Ficker* (a) unter 32 frisch isolierten Diphtheriestämmen nur drei finden, die mit Methylenblau ohne weiteren Zusatz reichlichere Körnchenfärbung ergaben. Im übrigen ist hierbei aber die Differenzierung durch Wasserspülen von großer Bedeutung (s. *Ficker*, S. 181).

Als ein ausgezeichnetes Mittel, die Körnchen zur Darstellung zu bringen, ist Vor- oder Nachbehandlung mit Säure oder Färbung in einem Farbstoffsäuregemisch, wie die Beispiele im vorigen Abschnitt zeigen, gefunden worden. Bei der *M. Neisserschen* Färbung ist die Essigsäure dies adjuvans. Günstiger wirkt nach *Fickers* vergleichenden Untersuchungen die Milchsäure, wenn man nicht nur bei Diphtheriebacillen (wie das ja gerade das Bestreben der *M. Neisserschen* Methode ist), sondern auch bei anderen Bakterienarten die Körnchen darstellen will. Die *M. Neissersche* Methode ist ja ganz und gar auf die Differenzierung von Diphtherie und Pseudodiphtherie zugeschnitten. Mit *Fickers* Körnchenfärbungsmethode gelingt es aber auch bei Pseudodiphtherie schon in jungen Kulturen ziemlich reichlich Körnchen darzustellen, ebenso bei Cholera, *Prodigiosus*, *Violaceus* u. s. w.

2. Körnchenfärbung nach Ficker (b).

Farblösung: Methylenblau med. pur. Höchst 1 : 10.000, Ac. lact. pur. 2%.

Herstellung: 1 g Methylenblau zu lösen in 100 cm³ Aqua dest., hiervon 1 cm³ zu 100 cm³ Aqua dest. (oder 0·1 : 10). Zu diesen 100 cm³ (oder 10) werden 2 cm³ (oder 0·2) Ac. lact. pur. hinzugefügt. Man hält sich die 1%ige Methylenblaulösung vorrätig, die Gebrauchslösung hält sich etwa 14 Tage. Der Milchsäuregehalt begünstigte Schimmelwachstum, daher Verwendung frisch gereinigter Gläser, Aufbewahrung unter Verschuß, Zufügen eines erbsengroßen Stückes Campher.

Verfahren. 1. Nach Fixation des Ausstriches aufgeben der Lösung für 15—30 Sekunden; 2. abgießen der Farbe, rasch trocknen zwischen Fließpapier; 3. Einschluß in Zedernöl oder Balsam. Wasserspülen fällt weg. Man kann auch 2 und 3 fortlassen und direkt in Farbe einschließen und besichtigen. Für diesen Fall kommt man auch aus mit Methylenblau 1 : 20.000.

Noch schönere Resultate erhält man mit der Methode des Durchsaugens.

Eine kleine Menge Kultur wird in einem kleinen Tropfen Leitungswasser verrieben. Auflegen eines Deckglases. Seitwärts in etwa 1 cm Entfernung wird ein Tropfen Farblösung aufgebracht und mit Öse zum Deckglasrand geleitet. Am gegenüberliegenden Rande des Deckglases wird mit Fließpapier die Farbe angesaugt. Wiederholen 4—6mal. Kontrolliert man unter dem Mikroskop, so erhält man eine isolierte Färbung der Körnchen.

3. Grimmes Methode mit Methylenblau-Schwefelsäure.

1. Material an Deckglas antrocknen, durch die Flamme ziehen; 2. färben mit Methylenblau 1 + 10; 3. unter dem Deckglas 1%ige Schwefelsäure durchsaugen. Volutin bleibt dunkelblau.

4. Methylenblau-Jodjodkalium (Grimme-A. Meyer).

1. Färben wie bei 3, absaugen der Farbe; 2. Zusatz von Jodjodkalium (Jodkalium 1, Jod 2, Wasser 200). Volutin schwarz, Protoplasma gelbbraun; 3. absaugen des Jods, Zulaufenlassen von 5%igem Natriumcarbonat. Protoplasma entfärbt sich schnell, Volutin langsam.

5. Rutheniumrot.

0·02 g Rutheniumrot in 10 cm³ heißem Wasser frisch gelöst. Volutin wird intensiv rot gefärbt.

4. Fetteinschlüsse.

Zur Färbung von Fettropfen im Bakterienplasma empfiehlt A. Meyer, das Material lebend oder nach Fixation mit Formaldehyd (40%ig) zu benutzen.

1. Von wässriger Bakteriensuspension (lebend oder fixiert) eine Öse zu einer kleinen Quantität von Sudan III (0.1 in 20 cm^3 95%igem Alkohol), Färbung rot, oder

2. zu einer aa. mit Wasser versetzten Lösung von Dimethylamidoozobenzol (0.4 g auf 100 g 95%igen Alkohol). Fetttröpfchen gelb, Plasma ungefärbt.

3. Ein Tröpfchen einer filtrierten 1%igen Lösung der Dimethylparaphenylendiaminbase wird mit wenig Bakterien verrührt, dazu einige Ösen einer Lösung von α -Naphthol in 1%iger Sodalösung. Nach einigen Minuten Fettropfen tief blau (Methode von *Dietrich* und *Liebermeister*, die im Hängetropfen beobachteten, aber die Fettnatur der blauen Körnchen bestritten; vgl. hierzu *A. Meyer*, S. 223).

Verfahren von *Bunge*.

Antrocknung. Fixation in der Flamme. 1. Präparate 2 Minuten mit Chloroform behandeln, dann 2. 3 Minuten mit Natriumsuperoxyd und Wasser; 3. 1 Minute mit Carbofuchsin kochen; 4. 15 Sekunden mit 5%iger Schwefelsäure entfärben. Nach *A. Meyer* kann man 1. und 2. fortlassen. *Bunge* deutet die rotgebliebenen Körner als Vorläufer der Sporen. *A. Grimme* und *A. Meyer* halten sie für Fettropfen.

Eisenbergs Methode zur Darstellung von Fetteinschlüssen (a, b).

I. 1. Präparat fixieren, 1—2 Minuten mit konzentriertem Jodjodkalium nach *A. Meyer* (Jod 3, Jodkali 3, Wasser 20) behandeln; 2. abspülen mit Wasser; 3. färben mit 10fach verdünntem Carbofuchsin. Zelleiher rosa, Granula intensiv rot.

II. 1. Fixiertes Trockenpräparat mit 1%iger wässriger Lösung von Viktoriablau B (G) 3—5 Minuten behandeln; 2. spülen mit Wasser; 3. Lugol 1—2 Minuten; 4. differenzieren mit *Nicolles* Acetonalkohol, bis kein Farbstoff mehr abgegeben wird; 5. Wasserspülen; 6. kurz nachfärben mit 10fach verdünntem Carbofuchsin.

Bessere Resultate erhält man, wenn man die Färbung oder Beizung an frischem in Wasser suspendiertem Material vornimmt und sodann erst ausstreicht und trocknet (s. *Eisenberg*). Alkoholische Lösung von Nilblau BB ergibt nach *Eisenberg* elektive Färbung der Fettgranula, sehr gut brauchbar ist auch Sudanbraun und Manchesterbraun (Vesuvial B). *A. Meyer* betont, daß nach den *Eisenbergschen* Methoden sich außer dem Fett noch andere Gebilde färben können.

III. Kernfärbung.

Das Studium der Zellkerne bei Bakterien ist durch gefärbte Ausstrichpräparate bisher noch sehr wenig gefördert worden. Literatur über die bisher veröffentlichten Methoden bei *A. Meyer*. Dasselbst auch Näheres über die von *A. Meyer* zur Darstellung des Kerns benutzten Methoden. 1. Formolfuchsin. 2 cm^3 konzentrierte alkoholische

Fuchsinlösung werden mit 10 cm^3 Alkohol (95%ig) und 10 cm^3 Wasser gemischt. Eine kleine Öse Kultur wird in einem Tropfen Formol auf dem Objektträger eingerührt, Einwirkungsdauer 4—5 Minuten. Danach Zusatz von 1—2 Tropfen Fuchsinlösung, mehrmals umrühren. Einwirkungsdauer 10 Minuten. Nun eine Öse untersuchen, eventuell weitere 5 Minuten warten. Kerne rotviolett.

2. Bakterienmaterial in Wasser 2 Minuten abkochen (zur Lösung des Volutins); 24 Stunden behandeln mit einer 2·5%igen Lösung von schwefelsaurem Eisenoxydammoniak, dann ebenfalls 24 Stunden mit Hämatoxylin nach *Delafield* (1:200). Differenzierung mit verdünnter Salzsäure (5 Tropfen auf 100 cm^3 Wasser).

3. Fixieren mit *Flemmings* Lösung, härten mit 20%igem Alkohol, färben mit *Delafields* Hämatoxylin. Differenzieren mit Salzsäurealkohol.

4. Fixation mit *Flemmings* Lösung, härten mit Alkohol, färben mit Eisenhämatoxylin, differenzieren mit Ferriammoniumsulfat.

Die Frage, ob das, was mit diesen Methoden zur Darstellung kommt, wirklich Kerne sind, ist noch nicht entschieden. Abgrenzung gegenüber Volutin u. s. w. s. *A. Meyer*.

5. Polfärbung.

Polfärbung bei Ausstrichen von Pest und der Pasteurella-Gruppe.

(Hühnercholera, Kaninchenseuche, Wildseuche u. s. w.).

1. Ausstrich von menschlichem oder tierischem Material fixieren 25 Minuten in Alcohol abs.; 2. trocknen; 3. färben mit wässriger Methylenblaulösung 5 Minuten; 4. Wasserspülen, trocknen.

Sobernheim nimmt die Alkoholfixation so vor, daß er auf das lufttrockene Präparat Alcohol abs. aufgibt, ihn kurz einwirken läßt, abgießt und den Rest über der Flamme abbrennt. Färbung.

Gaffky behandelt die Ausstriche $\frac{1}{2}$ Minute mit $\frac{1}{2}$ %iger Essigsäure vor, spült Wasser, trocknet und färbt. Als Farbe ist auch Carbolmethylenblau 1:10 oder Boraxmethylenblau (Aqua dest. 100·0. Borax 5·0, Methylenblau 2·0) $\frac{1}{2}$ Minute lang oder *Löfflersches* Methylenblau 2—3 Minuten lang zu empfehlen, auch stark verdünntes Carbofuchsin. *E. Gotschlich* benutzt konzentriertes Carbofuchsin, läßt einen ganz kurzen Moment einwirken und spült reichlich Wasser.

Kossels modifizierte *Romanowsky*-Färbung eignet sich ebenfalls gut zur Polfärbung bei Pest. Alkoholfixation, dann 8 Minuten kalt färben in folgender Mischung: Konzentriertes wässriges Methylenblau (M. med. Höchst) und 10fache Menge destilliertes Wasser. 1 cm^3 davon wird vor Gebrauch mit 3 Tropfen einer 5%igen wässrigen Lösung von krystallisierter Soda versetzt, dann unter Umschütteln Zusatz von 1%iger wässriger Eosinlösung (B. A. Extra Höchst) tropfenweise (pro 1 cm^3 Stammlösung 0·5—1·0 Eosinlösung). Cave Auftreten von Nieder-

schlag. Wasserspülen, ganz kurz in stark verdünnte Essigsäure (1 Öse auf 1 Petrischale Wasser). Wasserspülen, trocknen, Öl; oder *May-Grünwald* 2—5 Minuten (ohne vorherige Fixation), abspülen mit neutralem destillierten Wasser.

Eug. Fränkel und *Pielsticker* gelang die Polfärbung bei *Bacterium anthroposepticum* am besten nach folgender Methode: 1. Dreimaliges Erwärmen über der Flamme mit jedesmal erneuertem polychromen Methylenblau; 2. abspülen mit destilliertem Wasser; 3. kurzdauerndes Nachspülen mit Tanninorange; 4. abspülen mit destilliertem Wasser.

K. Spengler läßt zur Fixation 95%igen Alkohol 2—3 Minuten einwirken. Abgießen des Alkohols, langsam abdunsten lassen oder über der Flamme abdampfen. Färben mit wässrigen Verdünnungen alkoholischer Farblösungen (Fuchsin) oder *Löfflers* Methylenblau, eventuell leicht über der Flamme erwärmen. Sodann ganz kurz differenzieren mit 0.5%iger Essigsäure, abspülen in Wasser, trocknen.

Nach *Epstein* ist Hitze-fixation zu vermeiden, sie schädigt oder zerstört die Polfärbbarkeit. Will man Reinkulturen zur Polfärbung benutzen, so sind flüssige oder wasserreiche Nährböden zu verwenden.

Färbung einzelner Bakterienarten.

1. **Diphtheriebacillen:** a) Körnchenfärbung s. S. 293 ff.

b) *Gram*-Färbung s. S. 287.

2. Färbung von Gonokokkenausstrichen.

1. Empfehlenswerte Methode: 1. Ausstrich auf Objektträger nach Flammenfixation übergießen mit *Löfflers* Methylenblau. Färben kalt 10—30 Sekunden; 2. gut mit Wasser abspülen, trocknen.

2. Ich selbst bevorzuge Färbung mit ganz dünnem Methylenblau 1:10.000 bis 1:20.000. Als Vorratslösung dient eine 1%ige wässrige Methylenblaulösung, von der man 1—2 Tropfen auf eine drei Finger hohe Schicht von Aqua dest. im Reagensglas gibt. Färben $\frac{1}{2}$ Minute lang, Wasserspülen ganz leicht (kann auch weggelassen), trocknen.

Diese Methode vermeidet Überfärbungen und läßt die typische Gestalt der Gonokokken scharf hervortreten, da der Untergrund nur sehr zart gefärbt erscheint und auch die Zellkerne noch nicht die dunkle Tönung wie bei *Löfflers* Methylenblau angenommen haben.

Das gleiche erreicht man mit Borax-Methylenblau (Methylenblau med. pur. 2.0, Borax 5.0, Aqua fervid. 100.0) oder *Löfflers* Methylenblau, wenn man im Reagensglas mit Aqua dest. so weit verdünnt, daß die Lösung durchsichtig wird.

Wer rote oder violette Darstellung bevorzugt (hierbei erscheinen die Gonokokken größer als bei Methylenblaufärbung) geht von 1%iger

Fuchsin- oder 1%iger Gentianaviolettlösung aus und verdünnt sie wie oben auf etwa 1 : 10.000. Am wenigsten empfehlenswert ist Fuchsin, weil selbst dünne Lösungen auch die Kerne stark tingieren. *Hombberger* empfiehlt Kresylechtviolett 1 : 10.000 (Gonokokken violett, Kerne schwachblau).

Von ganz besonderer Bedeutung für die Gonokokkendiagnose ist die *Gramsche Färbung* geworden. Der Gonokokkus ist gramnegativ, hingegen verhalten sich viele Diplokokkenarten, die auf der normalen oder kranken Schleimhaut der Urethra, Vagina u. s. w. vegetieren und dem Gonokokkus an Gestalt ähneln können, aber nichts mit ihm zu tun haben, grampositiv oder gramzweifelhaft. Es wird also besonders in älteren Fällen die *Gramsche Methode* oft genug den Ausschlag geben. Man ist da vor eine verantwortungsvolle Aufgabe gestellt und muß die Methode peinlichst sorgfältig handhaben. Es ist hier zu verweisen auf alles das, was bei Besprechung des *Gram-Verfahrens* gesagt worden ist. Jedes willkürliche Abweichen von der festgelegten Methode kann da zu folgenschweren Irrtümern führen. Ich empfehle der auf S. 287 wiedergegebenen Vorschrift genauestens zu folgen, insbesondere ist die Anilinwassergentianaviolettlösung jedesmal frisch zu bereiten, ferner ist Wasserspülen zwischen den einzelnen Prozeduren völlig zu vermeiden (lediglich zum Abspülen der Kontrastfarbe ist es erlaubt). Man muß ferner die Sicherheit haben, daß man absoluten (96%igen) Alkohol verwendet. Für die Nachfärbung ist stark verdünntes Fuchsin zu empfehlen, von dem üblichen verdünnten Carbol-fuchsin (1 + 9) nimmt man 5—6 Tropfen auf 2—3 Finger breite Schicht (10 cm³) Aqua dest. im Reagensglas. Einwirkungs-dauer 1/2—1 Minute.

Als Gegenfärbungen sind empfohlen worden: Bismarckbraun (*Steinschneider* und *Galewsky*, *Jadassohn*, *Weinrich*), Safranin (*K. Touton*), Neutralrot (*V. Jensen*). Die von *Steinschneider* und *Galewsky* abgeänderte *Gram-Methode* (färben in Anilinwassergentianaviolett 25—30 Minuten, abspülen in Wasser, Jodjodkaliumlösung 5 Minuten, Alkohol abs. bis zur Entfärbung, abspülen, nachfärben mit Bismarckbraun) ist nicht empfehlenswert.

Da für den Praktiker die geringe Haltbarkeit der Anilinwassergentianaviolettlösung unbequem ist, wurde gerade auch für die Gonokokkenfärbung beim *Gram-Verfahren* die haltbare Carbolfarbe empfohlen. Hier seien die Färbvorschriften von *Jadassohn* und *A. Neisser* wiedergegeben.

Jadassohn empfiehlt:

1. 1 Minute färben in Carbolgentianaviolett (gesättigte alkoholische Gentianaviolettlösung 10 Teile, 2 1/2%ige wässrige Carbollösung 90 Teile);
2. abgießen;
3. übergießen mit Lugol, 1/2—1 Minute;
4. abgießen;
5. Alkohol abs. so lange, als noch Farbwolken abgehen;
6. abspülen mit Wasser;
7. Gegenfärbung mit Bismarckbraun (3 g auf 70 cm³ warmes steriles Wasser, hierzu 30 cm³ 96%igen Alkohol, schütteln, filtrieren).

*Gram-Färbung bei Sekretausstrichen nach**A. Neisser.*

1. Carbolgentianaviolett 1 Minute; 2. Lugollösung $\frac{1}{2}$ Minute; 3. differenzieren mit absolutem Alkohol bis zur völligen Entfärbung, trocknen lassen; 4. Methylgrün-Pyronin (*Pappenheim*) $\frac{1}{4}$ Minute; 5. Wasserspülen. Das Sekret muß dabei in gleichmäßig dünner Schicht auf dem Objektträger ausgestrichen sein.

Gram-Färbung bei Kulturpräparaten nach A. Neisser.

1. und 2. wie oben; 3. differenzieren mit 96%igem Alkohol, bis keine Farbwolken mehr abgehen. Dauert bei dünnen, gleichmäßig ausgestrichenen Präparaten etwa 10 Sekunden. Trocknen lassen; 4. Fuchsin (1 Teil konzentrierte alkoholische Fuchsinlösung, 20 Teile Aqua dest.) $\frac{1}{4}$ Minute; 5. Wasserspülen.

Jensens Abänderung des Gram-Verfahrens für Gonokokkenausstriche.

Jensen hält die Beize (Anilin) bei der Gramschen Färbung für unnötig, er verwendet wässrige Lösung. Als Vorratslösung dient ihm eine 1%ige wässrige Lösung von Methylviolett (6 B), die jahrelang haltbar ist. Im Bedarfsfall Verdünnung eines Teilquantums aa. mit destilliertem Wasser. Dadurch erfolgt eine schwächere Färbung als bei Verwendung von Beizen und leichtere Differenzierung. Jodjodkalilösung ist konzentrierter. *Jensen* empfiehlt die Methode nicht nur für Gonokokkenfärbung, sondern allgemein.

Vorschrift: Ausstriche dünn, in Flamme fixiert. 1. Färben in 0.5%iger Methylviolettlösung $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Minute; 2. abspülen mit Jodjodkali (1 : 2 : 100); 3. aufgießen von Jodjodkali und stehen lassen $\frac{1}{2}$ —1 Minute; 4. abspülen mit absolutem Alkohol (mindestens 99%ig); 5. entfärben mit absolutem Alkohol unter leichtem Hin- und Herneigen, auftropfen neuen Alkohols vom Rande her; 6. aufgießen einer 1%igen wässrigen Neutralrotlösung, $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Minute stehen lassen; 7. abspülen mit Wasser, trocknen.

Mit den hervorgehobenen Färbemethoden kommt man bei der Gonokokkendiagnose heute aus. Damit ist nicht gesagt, daß nicht noch Wünsche offen bleiben. Bei keiner anderen Bakterienart sind, abgesehen von den Tuberkelbacillen, so viele Darstellungsmethoden versucht und empfohlen worden.

Die meiste Mühe ist darauf verwendet worden, die Gonokokken von Zellplasma und Zellkernen zu differenzieren. Bei einfachen Färbungen hat man die Ausstriche nach der Färbung mit verdünnter Essigsäure oder Alkohol behandelt, auch Vorbehandlung damit ist empfohlen worden. Von diesen Methoden hat sich keine eingebürgert,

sie erübrigen sich bei Anwendung der dünnen Farblösungen, da diese auch die den Zellkernen aufliegenden Gonokokken scharf hervortreten lassen, eine besondere Differenzierung ist dabei unnötig. Hier sei auf die Methode von *Homberger* hingewiesen, der mit Kresylechtviolett 1 : 10.000 (*Leonhard, Mühlheim*) färbt (Gonokokken rotviolett, Kerne schwachblau), sowie auf die Methode von *H. Loeb*, der die mit 1% iger wässriger Methylenblaulösung gefärbten Präparate nach Trocknung mit 10% iger Natriumhyposulfitlösung $\frac{1}{2}$ —5 Minuten behandelt. Dabei tritt Aufhellung der Zellkerne sowie der übrigen Bakterien und auch von den meisten saprophytischen Kokken ein.

Einer größeren Verbreitung erfreuen sich die

Doppelfärbungen

die durch Kontrastwirkung den Nachweis vereinzelter Gonokokken fördern sollen, da Gonokokken und Zellen dabei verschiedenartige Färbung aufweisen. Dabei werden die Farben entweder nacheinander oder in Mischungen verwendet.

Bei der Nachprüfung aller dieser, zum Teil recht überflüssigen Methoden darf man sich nicht blenden lassen durch die Bilder, die frischer Trippereiter gibt; auf solche Präparate darf man sich nicht beschränken, sondern man muß die Prüfung auch auf Präparate von veralteten Fällen mit spärlicher Absonderung oder mit schwerer färbbaren Gonokokken ausdehnen. Bei frischen Fällen ist, wie schon hervor- gehoben, der Gonokokkennachweis so leicht, daß die einfachsten Methoden genügen.

I. Doppelfärbungen mit getrennten Farben.

Färbemethoden mit Methylenblau und Eosin.

Verfahren von *A. Neisser*.

1. Färbung in gesättigter alkoholischer Eosinlösung unter Erwärmen einige Minuten; 2. absaugen des Eosins mit Fließpapier; 3. gesättigte alkoholische Methylenblaulösung $\frac{1}{4}$ Minute; 4. Wasserspülen. trocknen, Einschluß. Gonokokken und Zellkerne blau, Protoplasma rosa.

Verfahren von *A. Lanz (a)*.

1. Präparat vorsichtig über Flamme fixieren; 2. $\frac{1}{2}$ —1 Minute in 20% ige Trichloressigsäure (*Acidi trichloracetici* 5·0, *Aqua dest.* 20·0). Präparat wird weiß; 3. kurz abspülen in Wasser; 4. trocknen mit Fließpapier, nochmals über Flamme fixieren; 5. färben in alkalischem Methylenblau (30 cm^3 *Aqua dest.* + 1—2 Tropfen 5% iger Lösung von *Kali causticum* und gesättigtem alkoholischen Methylenblau, bis Flüssigkeit dunkelblau wird) 2—5 Minuten; 6. spülen mit Wasser, trocknen, Balsam.

Gonokokken tiefblau, etwas kleiner als sonst. Zellprotoplasma mattblau. Durch die Trichloressigsäure werden die Zellen durchsichtiger, auch die Kerne. Man pflegt 7. Nachfärbung mit schwacher wässriger Eosinlösung anzuschließen, noch besser mit dünner Bismarekbraunlösung.

Verfahren von Ham.

1. Färben mit Carbolmethylenblau (konzentrierte Methylenblaulösung in 5%igem Carbolwasser) 15—20 Minuten; 2. entfärben drei Sekunden mit Essigsäure (10 Tropfen Acid. acet. glac. auf $\frac{1}{4}$ l Wasser); 3. färben mit 1%iger wässriger Eosinlösung.

Methylenblau dann Safranin.

Schütz färbt 5—10 Minuten in Carbolmethylenblau (5%ige Carbollösung, hierin Methylenblau gesättigt, filtriert). Darnach abwaschen in Wasser, entfärben in Essigsäurewasser (5 Tropfen Ac. acet. dil., 20·0 Aqua dest.) ganz kurz, nachfärben mit sehr dünner wässriger Safraninlösung. Gonokokken blau, Epithelien blaßblau, Eiterzellen und Kerne lachsfarben.

Ähnlich ist das Verfahren von *Galli-Valerio* (Thymolblau — d. i. gesättigte Lösung von Methylenblau und einige Tropfen gesättigter alkoholischer Thymollösung — dann Safranin).

Bitter färbt die dünnen Ausstriche 3 Minuten in KOH-Methylenblau (30 cm³ konzentriertes alkoholisches Methylenblau und 100 cm³ 0·02%iges KOH), Wasserspülen, $\frac{1}{2}$ Minute Safranin (1 Teil konzentrierte alkoholische Lösung und 4 Teile Wasser). Gonokokken tiefblau, Eiterkörperchen rot.

Fuchsin, dann Methylenblau.

Methode Schäffers.

1. Färben mit Carbofuchsin 1:20, 10—20 Sekunden; 2. Wasserspülen; 3. nachfärben und differenzieren mit 1%iger Äthylendiaminlösung die durch einige Tropfen Methylenblau hellblau gefärbt ist (auf 10 cm³ Äthylendiaminlösung nimmt man 2—3 Tropfen 10%iger wässriger Methylenblaulösung) 40 Sekunden.

Gonokokken schwarzblau, Kerne schwach blau, Protoplasma der Leukocyten hellrot. Spermatozoenkopf blau, Schwanz rot.

Färbung von Gonokokken nach v. Leszczyński mit Thionin-Pikrinsäure.

1. Fixation in Flamme; 2. 1 Minute Thioninlösung (gesättigte wässrige Thioninlösung 10, Aqua dest. 88, Ac. carbol. liquef. 2); 3. abspülen in Wasser; 4. 1 Minute Pikrinsäurelösung (gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung und 1‰ige Kalilauge zu gleichen Teilen); 5. 5 Sekunden Alcohol abs. (nicht vorher in Wasser). Diesen schnell verdunsten lassen (abblasen mittels Gummiballons); 6. Wasserspülung, trocknen.

Gonokokken dunkelbraun bis schwarz, andersartige Kokken hellrot. Zellkerne schwach gerötet, Zellprotoplasma gelb. Die extracellulären Gonokokken lassen fast regelmäßig die charakteristische Färbung vermissen.

Abänderung nach *E. Kindborg*.

1. Fixation in Flamme; 2. Carbolthionin nach *Nicolle* 1 Minute; 3. abspülen mit Wasser, abtupfen zwischen Fließpapier; 4. Aufträufeln alkalischer Pikrinsäurelösung (gesättigte wässrige Lösung mit 1‰iger Kalilauge zu gleichen Teilen); 5. Entfernen der Pikrinsäure durch ganz kurzes Übergießen mit Alkohol; 6. Wasserspülen, trocknen.

Gonokokken, auch die extracellulären, dunkelbraun (sepiafarben), alle anderen Bakterien rot. Zellkerne rot. Leukocytenkerne rot bis braunrot. Untergrund zart gelblich.

II. Doppelfärbungen mit Farbmischungen.

Methylenblau-Eosin.

Verfahren von *Klein-Finger*.

1. Fixieren in Alkoholäther aa 40 Minuten; 2. färben in Eosin-Methylenblau (0·5 Eosin gelöst in 100·0 konzentrierter wässriger Methylenblaulösung) 10—15 Minuten; 3. Wasserspülen, trocknen, Einschluß.

Methode von *Löffler (d)*.

1. Fixieren in Alkoholäther (aa) 40 Minuten; 2. färben in Eosin-färben in Boraxmethylenblau-Bromeosin (Borax 2·5, Methylenblau 1·0, Aqua dest. 100·0), hiervon 4 Teile, polychromes Methylenblau Unna 1 Teil. Hierzu 0·05%ige wässrige Bromeosin B extra oder extra A. G. (Höchst)-Lösung 5 Teile. Von älteren gereiften Boraxmethylenblaulösungen nimmt man nicht die 0·05%ige, sondern 0·05‰ige; 3. Wasserspülen; 4. entfärben mit einer Mischung von 177 Teilen Alkohol und 20 Teilen 1‰iger Bromeosinlösung und 3 Teilen Essigsäure; 5. Wasserspülen, trocknen.

Die Kerne werden damit zum Teil entfärbt, sie erscheinen blaßblau, Gonokokken dunkelblau, Zellen blaßrosa.

Auch die Farbmischungen von *Giemsa*, *May-Grünwald* u. s. w. werden benutzt, letztere empfohlen von *Simonelli*, er färbt Gonokokken-ausstriche 4—10 Sekunden.

Fuchsin-Methylenblau.

Methode von *Pick-Jacobsohn*.

1. Färben 8—10 Sekunden in 20 cm³ Aqua dest. + 15 Tropfen konzentriertes Carbofuchsin + 8 Tropfen konzentriertes Methylenblau; 2. abspülen mit Wasser, trocknen.

Gonokokken dunkelblau bis schwarz, Kerne hellblau, Protoplasma rötlich.

Fränkel nimmt die gleiche Farblösung, aber 50 Tropfen Carbol-fuchsin und färbt 5 Minuten.

Eine Mischung von Carbolglycerinfuchsin und Carbolglycerin-Methylenblau empfiehlt *Czaplewski*. Vorratlösungen: *a*) Fuchsin 1·0, Alkohol 10·0, Aqua dest. 100·0, Glycerin 90·0, Ac. carbol. liquef. 5·0; *b*) Methylenblau 1·0, Alkohol 10·0, Aqua dest. 100·0, Glycerin 90·0, Ac. carbol. liquef. 5·0. Vor Gebrauch 1 Teil *a* mischen mit 2—3 Teilen *b*. Färben 8—40 Sekunden.

J. R. Thim nimmt 1 Teil Carbolgentianaviolettlösung Grüber und 2 Teile Löfflers Methylenblau, die Mischung hält sich wochenlang. Färben 10—15 Sekunden in der Kälte. Wasserspülen, trocknen. Gonokokken und Kerne der Eiterkörperchen dunkelblau bis tiefblau, Protoplasma blaß- bis rötlichviolett. Epithelkerne dunkelviolett. Schleimfäden violett.

Fuchsin-Thionin.

Nach *A. Lanz*, Färbung 15—30 Sekunden in der Mischung: 1 Teil in 2%igem wässerigen Carbolwasser gesättigte Fuchsinlösung und 4 Teile in 2%igem wässerigen Carbolwasser gesättigte Thioninlösung. Gemisch vor Gebrauch frisch herstellen. Die Stammlösungen sind haltbar.

Gonokokken blau, Kerne bläulichrot, Eiterzellenprotoplasma rot.

Methylgrünmischungen.

Pappenheims Methylgrünpyroninmethode.

In 5 cm³ Aqua dest. ca. 2 Federmesserspitzen Methylgrün (00 kryst.) und ca. $\frac{1}{2}$ Federmesserspitze Pyronin (*Grüber*-Leipzig) lösen. Hierin Ausstriche 1 Minute färben. Wasserspülen, trocknen.

Gonokokken dunkelrot, Kerne blaugrün.

Gebrauchsfertig und haltbar ist *Unna-Pappenheims* Farblösung (*Grüber*): Methylgrün (00 kryst., gelblich) 0·15, Pyronin 0·25, Alkohol 2·5, Glycerin 20·0, 0·5%iges Carbolwasser ad 100·0. Färbung 2—5 Minuten.

Diese Färbungen ermöglichen auch das Auffinden von Gonokokken, die auf den Kernen lagern, die roten Kokken heben sich von den blaugrünen Kernen scharf ab, das Methylgrün hat eine besonders hohe Affinität zu den Kernen, ohne die Bakterien zu färben, das Pyronin färbt Kerne nur, wenn es im Übermaß zugesetzt wird (Kerne blaugrün, Kokken rot). Diese Methode gibt sehr schöne Bilder.

Krysztalowicz empfiehlt die gleiche Lösung, aber an Stelle der $\frac{1}{2}$ %igen Carbollösung eine 2%ige, dann genügt für die Färbung die Zeit von 20—30 Sekunden. Gonokokken rot, Leukocytenkerne hellgrünlich, Protoplasma der Leukocyten rosa, Epithelien stark rosa, Epithelkerne blauviolett.

Saathoff färbt 1—2 Minuten mit folgender Lösung (geringe Änderung der Lösungen *Unnas*): Methylgrün 0·15, Pyronin 0·5, 96%iger Alkohol 5·0, Glycerin 20·0, 2%iges Carbolwasser ad 100·0. filtrieren, darnach Wasserspülen, trocknen ohne Fließpapier. Allgemein an-

wendbar, besonders empfohlen für Gono- und Meningokokken, Rotlaufausstriche u. s. w.

Universalgonokokkenfärbemethode nach *Papenheim* (b).

1. Carbolgentianaviolett; 2. Jodjodkaliumlösung 3 Minuten; 3. Acetonalkohol nach *Nicollé* (Alkohol + $\frac{1}{3}$ Aceton) $\frac{1}{2}$ —2 Minuten; 4. Orange G, verdünnte Lösung; 5. absaugen mit Fließpapier; 6. Carbol-Methylgrün-Pyronin; 7. Wasserspülen, trocknen, Einschluß.

Gonokokken rot; grampositive Bakterien blauschwarz. Zellkerne blaugrün. Lymphocyten- und Epithelzelleiber rot, Leukocytenplasma und eosinophile Granula orange.

Färbung nach *A. v. Wahl*.

Farblösung: Auramin-Thionin mit Zusatz von Methylgrün, also ein Dreifarbengemisch. Konzentrierte alkoholische Auraminlösung 2·0, Alkohol (95 %ig) 1·5, konzentrierte alkoholische Thioninlösung 2·0, konzentriertes wässriges Methylgrün 3·0, Wasser 6·0. Die konzentrierten alkoholischen Lösungen sind in 95 %igem Alkohol über der Flamme heiß gelöst und kalt filtriert.

Färbedauer 5—15 Sekunden.

Grundton hellgrün, Gonokokken rötlich violett bis schwarz, Kerne der Leukocyten blaßbläulich-grün bis hellgrün, Plasma farblos oder hellgelb, an dicken Stellen hellgrün. Epithelien gelblich-grün. Andere Bakterien schwach oder nicht gefärbt.

Die Methode hat den Vorteil, daß man auch in den dickeren Schichten die Gonokokken unschwer auffindet.

Hierher gehören auch die Farbmischungen nach *v. Sehlen*, Carbofuchsin + Methylgrün; nach *Lenhartz* u. *Foulerton*: Dahliaviolett und Methylgrün.

Bettmann mischt 3 Teile einer Jodgrüncarbolwasserlösung (1·0 g Jodgrün in 100 cm³ eines 2 %igen Carbolwassers) mit 1 Teil einer 1 %igen Carbofuchsinlösung (Fuchsin 1·0, Alkohol 10·0, Acid. carbol. 5·0, Aqua dest. ad. 100·0). Eine 48 Stunden alte Mischung färbt am besten. Färbdauer 1 Minute. Darnach Wasserspülen. Gonokokken leuchtend hochrot, Bakterien und saprophytische Kokken rot. Zellkerne schwach grün (mitgeteilt von *O. Gans*).

3. Färbung von Influenzaausstrichen.

10 Minuten und länger mit verdünntem Carbofuchsin (1:10 bis 1:20). Weniger vorteilhaft ist *Löfflers* Methylenblau. Nach *Scheller* behandelt man die Präparate zweckmäßig mit 1 %iger Essigsäure vor, da das Mucin die Färbbarkeit der Bacillen beeinträchtigt. Doch ist diese Maßnahme bei der oben erwähnten von *R. Pfeiffer* angegebenen Färbvorschrift mit verdünntem Carbofuchsin unnötig.

I. de Seixas Palma gibt verschiedene Methoden zur Färbung der Influenzabacillen an, die noch der Nachprüfung bedürfen.

Präparat lufttrocken in Alkohol fixieren.

Methode I: 1. Färbung mit Carbofuchsin 1 : 10, 10 Minuten lang in der Kälte; 2. Wasserspülen; 3. entfärben mit 5%igem Anilinchlorhydrat 15—30 Minuten lang; 4. Wasserspülen; 5. 1 Minute nachfärben mit Methylenblau 1 : 10.

Methode II: 1. $\frac{1}{4}$ Stunde in 5%igem Quecksilberchlorid; 2. gut mit Wasser spülen; 3. 10%iges Natriumhyposulfit 1 Minute über Flamme bis zur Bildung feinsten Bläschen; 4. Wasserspülen.

Die Methode soll den „Zentralkörper“ schwarz auf gelblichem Hintergrund darstellen.

Methode III: Verbindung von I und II, u. zw. zunächst II, dann I. Es erscheint das Zentralkorn schwarz, Bacillenmembran rot, alle anderen Mikroorganismen (mit Ausnahme der Tuberkelbacillen) blau.

4. Färbung von Pestausstrichen, s. S. 300.

5. Färbung von Rotzausstrichen.

In frischen Ausstrichen von Gewebsmaterial färben sich die Rotzbacillen nicht schwer, besonders geeignet sind die mit Carbol hergestellten Farben (Carbofuchsin, Carbolmethylenblau [*Kühne*], Carbolthionin [*Nicolle*] od. dgl.), ferner *Löfflers* Methylenblau.

Löffler (e) selbst hat folgendes Verfahren für Färbung getrockneter Ausstriche empfohlen:

1. 5 Minuten in alkalischem Methylenblau färben; 2. eintauchen in 1%ige Essigsäure, die durch Zusatz von Tropäolin 00 in wässriger Lösung eine etwa rheinweingelbe Farbe erhalten hat; 3. schnell mit destilliertem Wasser nachwaschen.

Tropäolin bedingt Entfärbung des Zellplasmas sowie teilweise Entfärbung der Kerne ohne Entfärbung der Bacillen.

Statt *Löfflerscher* Methylenblaulösung kann unter 1 auch Anilinwassergentianaviolett oder Anilinwasserfuchsin verwendet werden, dem Kalilauge 1 : 10.000 oder 0·5%ige Lösung von Liqu. Ammon. caust. zu gleichen Teilen zugesetzt ist. Herstellung der Farblösung unmittelbar vor Gebrauch.

6. Färbung von Ausstrichen des *Streptobacillus ulceris mollis* Unna.

Methode *Unna* (briefliche Mitteilung).

Präparat wird hergestellt durch Abschaben mit einem Deckgläschen von der Unterseite des Geschwürsrandes und Abstreichen auf dem Objektträger. Fixieren wie gewöhnlich.

1. Vorfärben mit 1%igem Pyronin bis zum Aufsteigen von Dämpfen. 5 Minuten belassen in der warmen Lösung; 2. rasch abspülen; 3. nachfärben nach *Unna-Pappenheim* (Lösung bei *Grübler-Hollborn*) kalt.

Streptobacillen intensiv rot, Kerne mäßig violett.

W. Krantz änderte die ursprünglich von P. G. Unna empfohlene Rongalitweiß-Methode wie folgt ab: 1. Lufttrocknen, nicht erhitzte Ausstriche für 2 Minuten in Rongalitweiß. (Herstellung nach Unna: 100 cm³ einer 0·5%igen Lösung von Methylenblau werden mit ca. 7 Tropfen einer 25%igen Salzsäurelösung angesäuert. Von dieser werden 10 cm³ im Reagensglas mit 0·3 Rongalit gelinde erwärmt, bis Entfärbung eintritt. Wird die Lösung nach Erkalten trübe: filtrieren.) 2. Kurz Wasserspülen und kurz in Bunsenflamme erwärmen, dann sofort 3. Lösung von Liqu. Ammon. caust. 1 : 10 Wasser reichlich auftropfen, dabei bläut sich der Ausstrich; 4. kurz Wasserspülen, trocknen unter leichtem Erwärmen über der Flamme. Grund lichtblau, Streptobacillen dunkelblau.

7. Färbung von Tuberkelbacillen im Sputum.

Die heute in erster Linie empfehlenswerte Methode zum Nachweis von Tuberkelbacillen im Ausstrichpräparat ist folgende:

1. Sputum dünn verstreichen auf Deckgläsern oder Objektträgern;
2. lufttrocken werden lassen, Fixation in Flamme; 3. färben mit konzentriertem Carbofuchsin unter Erwärmen in Uhrschildchen oder Porzellantiegel über kleiner Flamme bis zur starken Dampfbildung. Farbe mehrere Minuten noch einwirken lassen; 4. Farbe abfließen lassen, dann entfärben in salzsaurem Alkohol (100 cm³ 90%iger Alkohol + 20 Tropfen konzentrierte Salzsäure) mehrere Sekunden; 5. Säure abspülen in reinem Alkohol 10—15 Sekunden, dann sofort 6. nachfärben mit wässriger Methylenblaulösung 2—3 Sekunden; 7. Wasserspülen, trocknen, einschließen.

Die Tuberkelbacillen sind rot in zartblauer Umgebung. Der salzsaure Alkohol ist ein relativ mildes Entfärbungsmittel. Es genügt oft eine einmalige mehrere Sekunden dauernde Entfärbung nicht, um das Präparat farblos zu machen, dann wird aus dem Alkohol (5) das Präparat nochmals in 4 übertragen und abermals mit Alkohol die Säure entfernt. Am besten nimmt man 2 Schälchen mit reinem Alkohol, damit die dem ersten Glas übermittelte Säure nicht nachwirkt. Für Dauerpräparate ist es unbedingt erforderlich, die Säure gut auszuwaschen. Statt des konzentrierten Carbofuchsin kann man auch frisch hergestelltes Anilinwasserfuchsin benutzen. Zur Entfärbung ist auch eine 5%ige Schwefelsäure geeignet, aus der man das Präparat nach 1—2 Sekunden in 60%igen Alkohol gibt und dann schnell mit Wasser spült, darnach Methylenblau wie oben. Auch hier darf man, falls nach Säureentfernung (60%iger Alkohol und Wasser) das Präparat noch nicht genügend entfärbt erscheint, wieder für 1—2 Sekunden in die Schwefelsäure zurückgehen.

Ein Fehler ist es, zur Gegenfärbung Methylenblau lange einwirken zu lassen oder konzentrierte Methylenblaulösungen zu verwenden. Es können dann Tuberkelbacillen die Gegenfarbe annehmen und die dickeren Sputumschichten färben sich dabei so stark, daß Tuberkelbacillen der Beobachtung entgehen. Ich vermeide daher das konzentrierte *Löfflersche* Methylenblau und verwende wässriges Methylenblau höchstens 2—3 Sekunden. Wenn in neuerer Zeit das Methylenblau zur Gegenfärbung für Tuberkelbacillenpräparate in Mißkredit gekommen ist, so liegt das vor allem daran, daß die Untersucher mit zu starken Lösungen oder zu lange gefärbt haben. Es besteht aber natürlich kein Grund, das Methylenblau einzubehalten, es kann durch Farben mit geringerer Zell- und Schleimaffinität ersetzt werden (s. S. 314).

Dieses zuverlässige Verfahren hat sich aus einer Reihe anderer Verfahren entwickelt, die in letzter Linie auf *Koch*, *Ehrlich*, *Ziehl-Neelsen* zurückgehen.

Ursprüngliche Methode *R. Kochs* (c).

1. Einlegen der Ausstrichpräparate für 24 Stunden in die „schwache alkalische Methylenblaulösung“ (1 cm^3 konzentrierte alkoholische Lösung von Methylenblau, 200 cm^3 Aqua dest., 0.2 cm^3 einer 10%igen Kalilauge); 2. kurze Nachbehandlung in konzentrierter wässriger Vesuvinslösung.

Tuberkel- und Leprabacillen blau, alle anderen Bakterien und Kerne braun, weil das Vesuin als Verdrängungsfarbe fungiert.

Eine wesentliche Verbesserung für die Darstellung der Tuberkelbacillen erreichte *Ehrlich* durch seine Anilinwasserfarben (Fuchsin, Methylviolett), die ungleich stärker tingierten, er entdeckte dabei auch die Eigentümlichkeit der Säurefestigkeit: einmal mit Anilinwasserfarben gefärbte Tuberkelbacillen hielten den Farbstoff auch nach Anwendung von Säuren (Salpetersäure) fest, während die übrigen Bakterien entfärbt wurden.

In seiner klassischen Arbeit „Die Ätiologie der Tuberkulose“ bevorzugt *R. Koch* das folgende Verfahren, das er ausdrücklich als *Ehrlich-sches* Verfahren bezeichnet. Modifikationen im verbessernden Sinne stammen dabei von *Weigert*, der das günstigste Mischungsverhältnis der Lösungen feststellte sowie von *Rindfleisch*, der die Färbungsdauer durch Erwärmen der Farblösung abkürzte.

Ehrlich-Kochs Methode (*R. Koch*, c, S. 276).

1. Das fixierte Deckglas wird auf die in einem Uhrglas oder flachen Schälchen befindliche Anilinwassermethylviolett- oder Anilinwasserfuchsinlösung mit der Schicht nach unten gegeben, erhitzen bis eben Blasen aufsteigen, dann 10 Minuten Farbe einwirken lassen (bessere

Resultate ergibt mehrere Stunden langes Färben auf der nicht erhitzten Lösung), in schwierigen Fällen (Nachweis vereinzelter Bacillen) mindestens 12 Stunden langes Färben; 2. behandeln der Präparate mit verdünnter (1 : 3) Salpetersäure einige Sekunden lang; 3. spülen in 60 % igem Alkohol durch mehrmaliges Hin- und Herbewegen; 4. nachfärben in verdünnter Vesuvinlösung (oder Methylenblau) einige Minuten; 5. abspülen, untersuchen in Wasser.

Die Anilinwassermethylviolettlösung bzw. die Anilinwasserfuchsinlösung stellte *R. Koch* nach der von *Weigert* angegebenen Vorschrift: 100 cm^3 Anilinwasser + 11 cm^3 gesättigte alkoholische Farblösung her, fügte aber noch 10 cm^3 Alkohol hinzu, wodurch sie etwa 10 Tage lang brauchbar blieb.

Die mangelhafte Haltbarkeit der Anilinwasserfarblösungen ist es denn auch, die ihre Verwendung unbeliebt gemacht hat, obwohl die Intensität ihres Färbens von den Ersatzlösungen nicht erreicht wird.

Ziehl hat 1882 die Carbolsäure zur Steigerung des Färbevermögens von Methylviolet an Stelle des Anilinwassers empfohlen und *Neelsen* führte 1885 das Carbofuchsin ein, das bis jetzt die beherrschende Stellung bei der Färbung der Tuberkelbacillen behauptet hat. Es färbt intensiv und ist dauernd haltbar. Nach *C. Günther* kommt es allerdings im Tinktionsvermögen der *Ehrlich'schen* Lösung nicht gleich, *Günther* gibt der frisch hergestellten Anilinwasserfuchsinlösung den Vorzug. Von Entfärbungsmitteln benutzten *Orth* die Salzsäure, *Neelsen* die Schwefelsäure (5—25 % ig), *Petri* den Eisessig; *Rindfleisch* schwach salpetersauren Alkohol. *Orth* salzsauren Alkohol. *Kaatzner* entfärbt mit einer Mischung von 100 cm^3 90 % igem Alkohol, 20 cm^3 Wasser und 20 Tropfen konzentrierter Salzsäure, nachspülen mit 90 % igem Alkohol zum Entfernen der Säure. *C. Günther* entfärbt 1 Minute in 3 % igem Salzsäurealkohol (100 Alkohol abs., 3 Salzsäure) unter Hin- und Herbewegen und entfernt dann die Säure durch Wasserspülen. Nach dem der Nachfärbung folgenden Trocknen erhitzt er das gefärbte Präparat, indem er es 3—10mal durch die Flamme zieht, ein Verfahren, das — wie *Unna* zuerst bei Leprapräparaten zeigte — die letzten Spuren Säure aus dem Präparat entfernt und damit die Färbung haltbar macht. Nach *C. Günther* ist die Haltbarkeit der Tuberkelbacillenfärbung bei Verwendung von Salzsäure eine größere als bei solcher von Salpetersäure, nach *Czaplewski* ist Schwefelsäure am wenigsten eingreifend, am meisten Salpetersäure, Salzsäure steht in der Mitte.

Gleichzeitige Entfärbung und Gegenfärbung.

Auf *B. Fränkel* gehen die Bestrebungen zurück, Entfärbung und Gegenfärbung in einem Akt zu vollziehen. Er mischt 50 Wasser, 30 Alkohol und 20 Salpetersäure und gibt soviel Methylenblau hinzu, als sich nach wiederholtem Schütteln löst. Filtration.

Methode von *B. Fränkel*.

1. Färben mit Anilinwasserfuchsin heiß 5—10 Minuten; 2. 1 bis 2 Minuten entfärben und färben in obiger Lösung; 3. abspülen in Wasser (oder essigsaurem $[\frac{1}{2}\%$ igen] 50%igen Alkohol); 4. untersuchen in Wasser.

Gabbet behandelt die nach *Ziehl-Neelsen* gefärbten Ausstriche 1—2 Minuten mit einer Lösung von 1—2 g Methylenblau in 100 cm³ 25%iger Schwefelsäure.

Pappenheims Methode mit Corallinmethylenblau (*A. Pappenheim, c*).

1. Färben in konzentriertem Carbofuchsin bis zum Sieden; 2. Abfließen lassen des überschüssigen Carbofuchsin; 3. ohne Abwaschung Entfärbung und Gegenfärbung durch 3—5maliges Eintauchen und langsames Abfließenlassen der folgenden Lösung: 1 Teil Corallin (Aurin, Rosolsäure) in 100 Teilen absoluten Alkohol gelöst, hierzu bis zur vollständigen Sättigung Methylenblau (6—10 g), hierzu 20 Teile Glycerin; 4. kurzes Abspülen in Wasser, trocknen, einbetten.

Tuberkelbacillen rot, Smegmabacillen blau. Diese sehr bequeme Methode wird von vielen Praktikern bevorzugt. Man muß aber bei negativen Resultaten daran denken, daß in den dickeren Sputumschichten etwaige Tuberkelbacillen durch die meist sehr intensive Blaufärbung verdeckt sein können. Ich ziehe deshalb die S. 310 geschilderte Methode vor.

Andere Verstärkungen für Fuchsin.

Methode von *Lübimoff*.

1. Färben mit Borfuchsin (0.5 Fuchsin, 0.5 Borsäure, 15.0 absoluter Alkohol, 20.0 Aqua dest.) 1—2 Minuten über der Flamme; 2. entfärben in Schwefelsäure 1:5; 3. abspülen mit Alkohol; 4. nachfärben mit Methylenblau (alkoholisch gesättigt) $1\frac{1}{2}$ Minuten; 5. Wasserspülen, trocknen, einschließen.

Böhm empfiehlt, das Präparat mit Borfuchsin 4—5 Minuten lang über der Flamme zu halten und dann 1 Minute mit 40%iger Phosphorsäure zu entfärben.

Ein Vorteil gegenüber der üblichen Methode besteht nicht.

Ishiwara.

1. Färben mit Petrolätherwassercarbofuchsin 2 Minuten unter wiederholtem Aufkochen. Gut Wasserspülen; 2. entfärben 2 Sekunden in 25%iger Salpetersäure mit nachfolgendem Abspülen in 70%igem Alkohol, bis das Präparat farblos erscheint. Gut Wasserspülen; 3. nachfärben mit gesättigter wässriger Methylenblaulösung, gut Wasserspülen.

Herstellung der Farbe: In ein Reagensglas wird soviel Petroläther gegeben, daß die Kuppe gefüllt ist. Hierzu $\frac{3}{4}$ Reagensglas voll destil-

lierten Wassers. Kräftig schütteln, filtrieren durch angefeuchtetes Filter, $\frac{1}{4}$ des Volumens konzentriertes Carbofuchsin hinzufügen.

Methode von S. L. Malowan.

Reagenzien: 1. Carbofuchsinlösung: 1 g Fuchsin, 10 cm³ 96%iger Alkohol, 90 cm³ Aqua dest., 5 cm³ Carbolsäure; 2. Anilinschwarzlösung: 1 g Anilinschwarz, 5 cm³ 96%iger Alkohol, 20 cm³ Aqua destillata, 1 cm³ Carbolsäure. Vor Gebrauch die Lösungen zweimal filtrieren. Mischen: 1 Teil Carbolanilinschwarz + 3 Teile Carbofuchsin; 3. Differenzierungsmittel: salzsaurer Alkohol (10 cm³ 96%iger Alkohol, 20 cm³ Aqua destillata, 0.2 konz. HCl).

Verfahren: 1. Fixation in Flamme oder Methylalkohol; 2. färben unter Kochen; 3. abgießen der Farbe; 4. übergießen zweimal für einige Sekunden mit salzsaurem Alkohol; 5. waschen mit 96%igem Alkohol bis zur völligen Farblosigkeit; 6. spülen mit Leitungswasser, trocknen, Einschluß.

Die Tuberkelbacillen bzw. säurefesten Bacillen erscheinen rot, Untergrund, Kokken u. s. w. schwarz bis grauschwarz. *Malowan* sieht in der Methode den Vorteil, daß die Stufen der Nachfärbung und Befreiung des Bildes vom Farbstoffüberschuß fortfallen.

Malowan empfiehlt zur Differenzierung von Tuberkelbacillen und anderen säurefesten Arten: Fixieren des Ausstriches in Mischung von 96%igem Alkohol + Petroläther + einigen Tropfen Benzol, Färbung in der Kälte mit Carbofuchsin oder Fuchsinanilinschwarz; nur die Tuberkelbacillen behalten den Farbstoff, die übrigen (Smegma u. s. w.) zeigen höchstens Granula (rot).

Abänderungen der Entfärbung und Gegenfärbung.

Die Sorge, bei der Säureentfärbung möchten auch Tuberkelbacillen entfärbt werden, veranlaßte schon *Ziehl*, Säure wegzulassen und direkt nach der Fuchsinfärbung mit Methylenblau nachzufärben (*Löfflers* oder konzentriertes alkoholisches oder wässriges Methylenblau). Auch die Methode von *Weichselbaum* folgt diesem Bestreben. Aber auch die zur Gegenfärbung benutzten Farblösungen können einen Verlust an Tuberkelbacillen bedingen, indem sie die Primärfarbe verdecken oder verdrängen. *Czaplewski* zeigte, daß hierzu die mit Alkali- oder Carbol-säurezusatz versehenen Lösungen imstande sind.

Methode von *Czaplewski* (b, c).

Czaplewski vermeidet bei der Entfärbung die starken Mineralsäuren (Salzsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure), die eine Entfärbung einzelner Tuberkelbacillen herbeiführen können. Anstatt dessen verwendet er den sauren Farbstoff Fluorescein.

Herstellung der Fluoresceinlösung:

Fluorescein (*Grübler*) 1 Teil, Alcohol abs. 100 Teile. 2 Tage stehen lassen, dann vom Bodensatz abgießen, hierzu Methylenblau 5 Teile, einen Tag stehen lassen, vom Bodensatz abgießen.

Ausführung: 1. Färben mit erwärmtem Carbofuchsin; 2. Abtropfenlassen der Farblösung, ohne Wasserspülung einige Sekunden eintauchen in die Fluoresceinmethylenblaulösung; 3. nochmals nachfärben durch 10—12maliges Eintauchen in konzentriertes alkoholisches Methylenblau (Methylenblau 5 Teile, Alcohol 100 Teile); 4. schnell mit Wasser spülen, trocknen.

Differentialmethode zwischen Tuberkel- und Smegmabacillen, letztere entfärbt.

Methode von *Weichselbaum*.

1. Färben in *Ziehl-Neelsenscher* Carbofuchsinlösung 2—3 Minuten; 2. Wasserspülen; 3. nachfärben mit konzentrierter alkoholischer Methylenblaulösung; 4. Wasserspülen.

Ein ähnliches Ziel verfolgt die Methode von *Peltriset*. Er benutzt zur Entfärbung Aceton, in welchem Methylenblau gelöst ist.

E. Marx empfiehlt zur Nachfärbung der Carbofuchsinpräparate *Chrysoidin* 1 : 300 3 Sekunden lang (vgl. *H. Kayser*, S. 320, Vesuvius hat schon *R. Koch* benutzt, s. S. 311).

M. Weiß benutzt nach der gewöhnlichen Färbung nach *Ziehl-Neelsen*, Entfärbung mit Salpetersäurealkohol und Abspülen mit destilliertem Wasser zur Nachfärbung eine 1‰ige *Permanganatlösung* (Kal. hypermang. 0·1, Aqua dest. 100·0) 2—5 Minuten, dann spülen mit destilliertem Wasser. Die schleimige Substanz des Ausstrichs erscheint dadurch hellgelb bis bräunlich.

Bei der Methode *Konrichs* erfolgt die Entfärbung durch Reduktion des Fuchsin mittels Sulfit und die Nachfärbung durch Malachitgrün. Damit sind die Vorteile gegeben, daß Alkohol und Säure vermieden werden, daß Entfärbung der Tuberkelbacillen nicht stattfinden kann und daß die Gegenfärbung schwach, gewissermaßen verwaschen ausfällt.

Konrichs Verfahren: 1. Färben $\frac{1}{2}$ —2 Minuten mit heißem (nicht kochendem) Carbofuchsin (nicht Anilinwasserfuchsin); 2. kräftig abspülen mit Wasser; 3. entfärben mit 10%iger wässriger Natriumsulfitlösung bis zur völligen Entfärbung. Dies dauert einige Sekunden, bei älteren Lösungen oder dickeren Ausstrichen bis zu einigen Minuten; 4. abspülen mit Wasser; 5. nachfärben $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Minute mit wässriger Malachitgrünlösung (gesättigte wässrige Malachitgrünlösung 50 + 100 Wasser). Die Sulfitlösung entfärbt nach und nach langsamer, man benutzt sie zweckmäßig nur 3—4 Tage. Eine 5%ige Sulfitlösung ist auch verwendbar, muß aber täglich frisch bereitet werden.

H. S. Lulte-Tigges folgt dem *Konrichs*chen Verfahren, empfiehlt aber ab 5 zur Gegenfärbung wässrige konzentrierte Pikrinsäurelösung

5—10 Sekunden, da damit die Präparate eine gute Durchsichtigkeit erhalten (Tuberkelbacillen leuchtend rot auf hellgelbem Hintergrund). Nachteile: mangelhafte Zeichnung der Zellstruktur, schlechte Färbung von Antiforminpräparaten.

Verwendung von Pikrinsäure.

Die Methoden, die sich des Pikrinsäurealkohols zum Entfärben und Nachfärben bedienen (*Tarchetti*, konzentrierte alkoholische Lösung von Pikrinsäure), reichen nicht an die üblichen Methoden der Tuberkelbacillenfärbung heran, da einmal die Entfärbung ziemlich lange und je nach Dicke der Schicht ziemlich schwankende Zeit erfordert und ferner die Gegenfärbung leicht unvollkommen ausfällt, so daß einerseits auch andere Bakterien als die Tuberkelbacillen noch rot gefärbt erscheinen und anderseits der Untergrund noch rötlich bleibt. Es ist auch möglich, daß Pikrinsäure hierbei nicht als Entfärbungsmittel, sondern als Beize wirkt (*Eisenberg*).

Kühnes Methode.

1. Färben 5 Minuten in Carbolfuchsin (kalt); 2. entfärben in 30%iger Salpeter- oder Schwefelsäure; 3. Wasserspülen, trocknen; 4. untersuchen in einem Tropfen mit Pikrinsäure leicht gelb gefärbten Anilinöls (2—3 Tropfen einer konzentrierten Lösung von Pikrinsäure in Anilinöl setzt man zu einem Blockschälchen reinen Anilinöls).

Pikrinmethode Spenglers.

1. Carbolfuchsin unter Erwärmung; 2. Pikrinsäure-Alkohol (50 cm³ gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung oder 50 cm³ *Esbachs* Reagens und 50 cm³ Alcohol abs.) nach Abgießen des Fuchsins 2—3 Sekunden, dazu 3—4 gtt. 15%ige Salpetersäure und wieder Pikrin bis zu schwacher Gelbfärbung von Sputumbelägen, 5—10 Sekunden. Wasserspülen, trocknen oder 3. abspülen mit 60%igem Alkohol direkt nach Pikrinwirkung; 4. aufgießen von 15%iger Salpetersäure bis bei Sputumbelägen nach einigen Sekunden leichte Gelbfärbung sich zeigt; 5. abspülen mit Alkohol; 6. Kontrastfärbung mit Pikrinsäurealkohol bis zur Gelbfärbung von Sputumschichten. Wasserspülen, trocknen.

Bacillen leuchtend rot, Untergrund gelb. Begleitbakterien entfärbt. Die Präparate sind nicht gut haltbar.

Pikrinsäure verwenden auch *Kirchenstein*. s. S. 324. *Schulte-Tigges*, s. S. 315.

Jötten und *Haarmann* bevorzugen die *Spenglersche* Methode unter folgender Vereinfachung: 1. Färbung mit Carbolfuchsin wie üblich; 2. Entfärbung mit 15%iger Salpetersäure ca. 20 Sekunden; 3. kurz Wasserspülen; 4. weitere Behandlung mit Salpetersäure 10 Sekunden; 5. Wasserspülen; 6. nachfärben 30 Sekunden mit *Spenglers* Pikrinsäurealkohol (gesättigte wässrige Pikrinsäure + Alcohol abs. aa.); 7. Wasserspülen, trocknen.

Bender vermeidet Salpetersäure und alkoholische Pikrinsäure, da bei Verwendung beider die Tuberkelbacillen einen leicht braunen Ton annehmen. 1. 2 Minuten färben mit konzentriertem Carbofuchsin unter Erwärmen bis zum Bläschenspringen; 2. entfärben mit 3%igem Salzsäurealkohol unter abwechselndem Waschen mit Wasser bis möglichst zum völligen Schwinden der Rotfärbung; 3. färben mit gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung (ca. 1%) 1 Minute lang mit nachfolgendem guten Spülen in Wasser.

Methode von *B. Ulrichs*.

Ersatz der Pikrinsäure durch Chromsäure.

1. Färbung mit konzentriertem Carbofuchsin unter leichtem zweimaligen Erwärmen; 2. entfärben in 15%iger Salpetersäure und 70%igem Alkohol; 3. 1 Minute Gegenfärben mit Chromsäurealkohol (Acid. chrom. 1·0, 60%iger Alkohol ad 100·0); 4. kurzes Abspülen mit Wasserstrahl; 5. langsam und vorsichtig an Flamme trocknen.

Tuberkelbacillen rot auf lila gefärbtem Grund.

Entfärbung durch alkalische Mittel nach Färbung mit Carbofuchsin.

Von den Methoden, bei welchen alkalisch reagierende Entfärbungsmittel in Anwendung kommen, seien erwähnt:

1. Methode von *Rondelli* und *Buscalioni*.

1. Färben mit Carbofuchsin, heiß, einige Minuten; 2. waschen in Wasser; 3. entfärben in Eau de Javelle, bis die rote Farbe in eine bräunlich-gelbe übergeht (je nach Alter des Eau de Javelle 2—3 Minuten); 4. abspülen in Wasser.

Die Tuberkelbacillen sind rot auf gelbem Grunde.

Die Methode leidet an verschiedenen Mängeln: die Sputumschicht löst sich leicht ab, man muß sehr vorsichtig mit Wasser (unter 3) spülen. Vor allem ist das Eau de Javelle in seinem Entfärbungsvermögen ganz vom Alter abhängig. Nach *Böhm* ist auch die Zahl der zur Darstellung kommenden Tuberkelbacillen vermindert.

2. Methode von *A. Müller*.

1. Färbung mit *Ziehl-Neelsen*, nach Wasserspülung; 2 *a*) entfernen des überschüssigen Farbstoffes mit verdünntem Alkohol (60—70%ig); 3. Einlegen in eine frisch bereitete 5—10%ige Kaliumpercarbonatlösung ($K_2C_2O_6$) mindestens $\frac{1}{4}$ Stunde bis zur Entfärbung; 4. auswaschen mit Wasser; 5. nachfärben mit Methylenblau oder 2 *b*) entfärben in Wasserstoffsuperoxydlösung ($\frac{12}{13}$ Volumprozent), die durch Zusatz von Soda- oder Pottaschelösung deutlich alkalisch gemacht ist (unmittelbar vor Gebrauch), wenige Minuten; weiter wie oben.

Die Methoden *Müllers* bieten keinen besonderen Vorteil, 2 *a*) dauert länger als die üblichen und bei 2 *b*) stört die mangelnde Haltbarkeit der Entfärbungslösung.

Alkalifestigkeit nach Gasis.

Färbung nach Gasis I.

Farblösung: 5 cm^3 einer 1%igen Eosinlösung (1 g krystallisiertes Eosin, 5 cm^3 Alkohol abs., 95 cm^3 Aqua dest.) werden mit einem linsengroßen Stück Quecksilberchlorid im Reagensglas langsam unter Umschütteln gekocht bis zur Lösung.

Entfärbungsmittel: Natriumhydrat 0·5, Kaliumjodid 1·0, 50%iger Alkohol 100·0.

Kontrastfarbe: Methylenblau krystallisiert 1·0, Alkohol abs. 10·0, Salzsäure 0·5, Aqua dest. 90·0.

Verfahren: 1. Das fixierte Ausstrichpräparat wird 1—2 Minuten lang mit warmer Farblösung bedeckt; 2. Wasserspülen; 3. übergießen mit dem Entfärbungsmittel, bis die rote Farbe verschwunden ist und weißgrüne Farbe auftritt; 4. Entfernung des Entfärbungsmittels durch absoluten Alkohol, gründliche Wasserspülung; 5. Kontrastfärbung mit Methylenblau 2—3 Sekunden; 6. Wasserspülen, trocknen über kleiner Flamme.

Die Tuberkelbacillen sind alkalifest, hellrot, alles übrige ist blau (auch Smegmabacillen sind nicht alkalifest). Die Präparate sind ganz dünn auszustreichen. Bei dicken Präparaten ist die Entfärbung schwieriger und kann leicht dazu führen, daß auch einige Tuberkelbacillen entfärbt werden.

Die Farbstofflösung setzt schon nach wenigen Stunden stark ab und ist daher immer frisch zu bereiten.

Methode von Gasis II.

Farbstoff: 3 g krystallisiertes Quecksilberchlorid sind in 100 cm^3 Aqua dest., welches 5 cm^3 Alkohol abs. enthält, unter Erhitzen aufzulösen. Hierzu wird sogleich 1 cm^3 Zedernöl hinzugefügt, weiter gekocht, bis milchartiger Zustand erreicht ist. Warm filtriert. In einem anderen Glas wird 1 g krystallisiertes Eosin in einigen Kubikzentimetern destillierten Wassers gelöst. Beide Lösungen werden vermischt. Nach Erkalten filtrieren. Einen Tag stehen lassen, wieder filtrieren. Die Farblösung ist einige Wochen haltbar.

Entfärbemittel: Natriumhydrat 1·0, Kaliumjodid 0·5 in 100 cm^3 Alkohol (50%ig).

Verfahren: 1. Übergießen des Präparates mit dem gut geschüttelten Farbstoff, erwärmen über kleiner Flamme bis Dämpfe aufsteigen. 1 Minute lang stehen lassen; 2. vorsichtiges Bespülen mit dem Entfärbemittel, bis rote Farbe verschwunden und durch tiefgrüne ersetzt wird; 3. sofort Alkohol (90%ig); 4. Aqua destillata; 5. 2—3 Sekunden Methylenblau (Methylenblau 0·1 in 80 cm^3 Aqua destillata gelöst, hierzu 20 cm^3 Alkohol abs. und 1 cm^3 Salzsäure); 6. Wasserspülen, abtrocknen über Flamme.

Telemann

vereinfachte die Methode von *Gasis* dahin, daß er zur Färbung das gewöhnliche konzentrierte Carbolfuchsin, zur Entfärbung ein Kalilaugealkoholgemisch benutzt, hergestellt aus der käuflichen 30%igen Kalilauge und 60%igem Alkohol im Verhältnis 1:3 15—60 Sekunden. Nachfärbung wie bei *Gasis* mit saurem Methylenblau.

(*Smegmabacillen* auch nach dieser Methode stets negativ.)

Färbungen mit Krystallviolett und Grammodifikationen.

Die Methoden dieser Kategorie verdienen Beachtung in allen Fällen, in denen das Präparat nach *Ziehl-Neelsen* im Stich läßt. Es muß aber betont werden, daß auch bei den besten Verfahren zur Darstellung der granulären Formen der Tuberkelbacillen Kokken, die der Entfärbung Widerstand leisten, zu Täuschungen Anlaß geben können und daß ferner die nach diesen Methoden gefärbten Bacillen nicht in jedem Falle Tuberkelbacillen sind. Die Präparate sind daher mit größter Kritik zu beurteilen.

I. Methoden nach *Herman*.

1. Färben über der Flamme bis zur Dampfbildung in folgender Lösung: 3 Teile 1%ige wässrige Lösung von Ammoniumcarbonat als Beize, 1 Teil 3%ige Lösung von Krystallviolett (Methylviolett 6 B) in 95%igem Alkohol als Farbe, eine Minute einwirken lassen; 2. entfärben in 10%iger Salpetersäure einige Sekunden; 3. spülen in 95%igem Alkohol bis Präparat hellblau wird; 4. abspülen mit Wasser, dann destilliertes Wasser.

Die Tuberkelbacillen erscheinen veilchenblau auf blaßblauem Grunde. Granula positiv. Gegenfärbung erleichtert das Aufsuchen der Tuberkelbacillen, man nimmt entweder 1%ige wässrige Eosinlösung $\frac{1}{2}$ Minute (*Herman*) oder *Mayers* Carmin (*Caan*), s. unten, oder verdünntes Carbolfuchsin (*Wirth*), oder Bismarckbraun (*Berka*), Chrysoidin (0.3%ig, *Macalister*), oder dünne wässrige Lösung von Safranin, kurz! (*J. Böhm*). *W. Frei* läßt die Kontrastfarbe fort, so wie es auch *Herman* zunächst tat. Die Farbmischung *Hermans* ist nicht haltbar, sie ist vor jeder Färbung frisch herzustellen. Die beiden Stammlösungen halten sich.

Modifikation der *Hermanschen* Methode von *Caan*.

1. Vorfärbung mit sorgfältig filtriertem salzsauren Carmin (*Paul Mayers* Carminlösung) ca. 10 Minuten; 2. Differenzierung mit 1%igem Salzsäurealkohol (1 cm³ reine HCl. auf 100 cm³ 70%igen Alkohol); 3. kurz spülen mit destilliertem Wasser; 4. Färbung mit der gut gemischten und filtrierten Ammoniumcarbonatkrystallviolettlösung (siehe *Herman*); 5. Entfärbung mit 10%iger Salpetersäure (mehrere Sekunden)

und mit 96%igem Alkohol, bis Carminton wiederkehrt; 6. kurz auswaschen in destilliertem Wasser, trocknen (vorsichtig über der Flamme), Balsam.

Tuberkelbacillen violettschwarz auf carminrotem Grund.

Berkas Abänderung der *Hermanschen* Methode.

1. Präparat erwärmen in der Flamme mit Ammoniumcarbonatkrystallviolett (3 Teile 1%iges wässriges Ammoniumcarbonat, 1 Teil konzentriertes alkoholisches Krystallviolett); 2. differenzieren mit 10%iger Salpetersäure, wenige Sekunden nachher 95%iger Alkohol; 3. nachfärben mit Bismarckbraun 2·0, Alkohol 95%ig 60·0, Aqua destillata 40·0 1 Minute; 4. abspülen mit Wasser, trocknen.

H. Kayser erhitzt die Präparate in der *Hermanschen* Farbe, entfärbt einige Sekunden in 10%iger Salpetersäure und dann in 96%igem Alkohol. Keine Gegenfärbung, Tuberkelbacillen tiefviolett. Falls Gegenfärbung gewünscht: Vesuvin kurz.

Ähnlich ist das Verfahren *Schaedels*, das wegen der milderen Entfärbung den Vorzug verdient (s. unten).

Kongstedts Abänderung der *Hermanschen* Methode.

1. Präparat wiederholt zum Sieden erwärmen und 1 Minute liegen lassen in der Farbflüssigkeit: 1 Teil 3%ige Krystallviolettlösung und 2 Teile 1%ige Ammoniumcarbonatlösung; 2. entfärben möglichst schnell, nur wenige Sekunden in 10%iger Salpetersäure und dann 95%igem Alkohol; 3. nachfärben in 0·5%iger alkoholischer Eosinlösung (oder ganz schwacher wässriger Pikrinsäurelösung).

Auch *Boits* Methode vermeidet Methylenblau zur Gegenfärbung.

1. Fixierung der möglichst dünnen Sputumschicht wie üblich; 2. Carbolfuchsin unter vorsichtigem Erwärmen bis zur ersten Dampfbildung. Abspülen in Wasser; 3. entfärben in 15%iger Salpetersäure; 4. abspülen in 60%igem Alkohol; 5. gegenfärben mit gesättigter Tropäolinlösung wenige Sekunden; 6. abspülen in Wasser, trocknen zwischen Fließpapier. Bacillen rot, Granula dunkelrot, Untergrund dunkelgelbrötlich.

Pranus glaubt, daß die Ablehnung des Methylenblaus als Gegenfarbe auf Daltonismus beruhe. Es ist aber hervorzuheben, daß in dickeren Ausstrichschichten bei Methylenblaugegenfärbung diese Farbe so stark gespeichert werden kann, daß Tuberkelbacillen der Untersuchung sehr wohl entgehen können. Deshalb empfehle ich nicht das starke *Löfflersche* Methylenblau, sondern wässriges, ganz kurz, s. S. 310.

Schaedels Methode der Tuberkelbacillenfärbung für Rotblaublinde.

Farbmischung: Methylviolett BN in konzentrierter alkoholischer Stammlösung. Vor Gebrauch filtrieren und mit 9 Teilen 2%igem Carbolwasser mischen. 1. Färbung entweder a) erhitzen über der Flamme bis

zum dreimaligen Aufkochen. Wiederholen 3—5mal unter Erneuerung der Farbe oder *b*) färben 6 Stunden im Brutschrank (Standglas) oder *c*) 24 Stunden bei Zimmertemperatur; 2. abspülen mit scharfem Wasserstrahl; 3. entfärben mit 3%igem Salzsäurealkohol; 4. abspülen; 5. gegenfärben mit Bismarekbraun 2 Minuten oder Chrysoidin. Grund hellbraun, Tuberkelbacillen violett bis violettschwarz. Dieses Verfahren bringt gleichzeitig auch die granulären Formen gut zur Darstellung.

II. *Muchs* abgeänderte *Gram*-Methoden.

Muchs Verfahren 2.

1. Färben unter Aufkochen oder 24 Stunden bei 37° (oder 48 Stunden im Zimmer) in Methylviolett (10 cm³ alkoholisch gesättigte Lösung von Methylviolett BN in 100 cm³ 2%iger wässriger Carbolsäurelösung, filtrieren); 2. 1—5 Minuten *Lugolsche* Lösung; 3. 1 Minute 5%ige Salpetersäure; 4. 10 Sekunden 3%ige Salzsäure; 5. differenzieren in Acetonalkohol (aa).

Muchs Verfahren 3.

1. Färben wie bei Verfahren 2; 2. entfärben 2 Minuten in Jodkaliumwasserstoffsuperoxyd (Jodkali 5·0, 2%iges Wasserstoffsuperoxyd 100·0); 3. abwaschen in absolutem Alkohol.

Die Körner erscheinen bläulich schwarz.

Die Methode 2 scheint die brauchbarste zu sein, aber auch sie ergibt Niederschläge, die Granula vortäuschen können. Am ehesten vermeidet man sie, wenn man nicht aufkocht. Die Methode 1 ist im wesentlichen die übliche *Gramsche*, bei der Entfärbung mit Alkohol und Nelkenöl stattfindet. Hierbei ist die Entfärbung so milde, daß auch andere Mikroorganismen noch bläulich erscheinen. Hierher gehören auch die Verfahren von *Rosenblat*, *Hatano*, *Fontes*, *Knoll*, *Weiss*, *Berger*, die das *Much*-Verfahren mit der *Ziehl*-Färbung vereinigen (entweder nacheinander oder gleichzeitig).

Kombination der Färbemethode nach *Ziehl* und *Gram*.

Stephanie Rosenblat färbte Sputumpräparate zuerst nach *Gram*-Methode II, sodann nach *Ziehl*.

S. Rosenblat übergießt das nach *Ziehl-Neelsen* gefärbte Präparat mit kalter Methylviolettlösung (nach *Much*) für 3—5 Minuten, nachher mit *Lugol*-Lösung ca. 2 Minuten, entfärben mit 10%igem Acetonalkohol.

Bakterienleib rot, Granula fast schwarz (blauschwarz).

Methode von *Fontes*.

1. Färbung wie üblich mit konzentriertem Carboolfuchsin; 2. waschen in Leitungswasser; 3. ca. 2 Minuten mit Carbolkrystallviolett färben; 4. Behandlung mit *Lugol*, bis sich kein Metallspiegel mehr bildet;

5. behandeln mit Acetonalkohol (aa.); 6. waschen in Leitungswasser;
7. färben mit Methylenblau.

Tuberkelbacillen rot, Granula stark violett. Pseudotuberkelbacillen violett gefärbt. Andere Bakterien blau.

Berger färbt zunächst nach *Gram* und läßt sodann konzentriertes Carbolfuchsin 10—30—60 Sekunden kalt einwirken und spült die Farblösung in 1%igem salzsauren Alkohol ab, bis der Ausstrich blaßrote Farbe annimmt.

Nach dieser Methode sind oft die scheinbar isoliert liegenden Granula mit einem roten Saum umgeben.

Methode von *Wehrli* und *Knoll*.

1. 2—3 Minuten färben bis zur Dampfbildung in einer filtrierten Mischung von Methylviolett (*Much* 2) und konzentriertem Carbolfuchsin;
2. behandeln mit Jodkaliumwasserstoffsuperoxyd (*Much* 3) 5 Minuten, oder Lugol (wie *Much* 2) 10 Minuten;
3. differenzieren in 1%igem Salzsäurealkohol (70%ig) bis erste bläuliche Wolken neben den roten Fuchsinabgängen erscheinen;
4. Alkohol abs., erneuert;
5. trocknen, Balsam.

Doppelfärbung nach *Weiss* (Farbstoffgemisch, einzeitige Färbung).

Farblösung: Mischung von konzentriertem Carbolfuchsin $\frac{3}{4}$, Methylviolett BN, konzentrierte alkoholische Lösung 10 cm^3 in 100 cm^3 einer 2%igen Carbolwasserlösung $\frac{1}{4}$. Die Mischung hält sich nur 8 Tage.

Ausführung: 1. 2 Tage lang bei Zimmertemperatur färben in der Carbolfuchsinmethylviolett-mischung (frisch filtriert); 2. jodieren mit Lugol 5 Minuten kalt oder erwärmen über der Flamme bis Dämpfe aufsteigen; 3. 5%ige Salpetersäure 1 Minute; 4. 3%ige Salzsäure 10 Sekunden; 5. Acetonalkohol (aa) so lange, bis kein Farbstoff mehr abfließt. Wiederholtes Kontrollieren des Präparates unter dem Mikroskop; 6. abtrocknen zwischen Fließpapier; 7. nachfärben mit 1%igem Safranin 5—10 Sekunden oder Bismarckbraun 1 Minute; 8. abspülen mit Wasser, trocknen, Einschluß.

Körner blauschwarz, Stäbchen rötlich.

Methode von *S. Hatanö*.

1. Carbolfuchsin, erwärmen bis zur Dampfbildung. Liegenlassen des Präparates für 5 Minuten, abtropfen, waschen in Wasser;
2. 10 bis 30 Sekunden in 25%iger Schwefelsäure;
3. einlegen in 75%igen Alkohol bis zum Verschwinden der Farbe;
4. nachfärben mit Methylenblau 2 Minuten;
5. Wasserspülen;
6. auftropfen von filtriertem Anilinwasser-gentianaviolett, erwärmen bis zur Dampfbildung, stehen lassen 3—5 Minuten, abgießen;
7. Jodjodkalium 3—5 Minuten;
8. entfärben in absolutem Alkohol, Toluol, Balsam.

Methode von *Carpintero*.Kombination von *Ziehl* und *Lugol*.

Methode *A*: 1. 3 Minuten färben mit Carbofuchsin unter Erwärmen; 2. abspülen; 3. 5 Minuten lang *Lugol*; 4. abspülen; 5. entfärben mit Salpetersäure 1:3; 6. entfärben mit absolutem Alkohol oder Acetonalkohol; 7. abspülen; 8. nachfärben mit Methylenblau.

Methode *C*: 1—4 wie *A*, dann 5. entfärben in Acetonalkohol; 6. abspülen; 7. 1—2 Minuten entfärben in 1%iger Natriumsulfitlösung; 8. abspülen; 9. nachfärben mit Methylenblau.

Namentlich bei *C* tritt Granulafärbung ein.

Weitere Modifikationen der *Muchsen* Färbung und Granuladarstellung bei Tuberkelbacillen.

v. Beteghs Methode. Zur Unterscheidung von Tuberkel- und Perlsuchtbacillen (*b*-Tolinfärbung).

1. Fixieren des dünnen Ausstriches in der Flamme; 2. beizen mit 2—3 Tropfen 15%iger Salpetersäure und erhitzen über der Flamme, bis außerhalb ihrer schwache Dämpfe aufsteigen; 3. abspülen mit Wasser; 4. mit *Löfflers* Methylenblau und konzentriertem Carbofuchsin aa. erhitzen, bis zur schwachen Dampfbildung; 5. entfärben in 60%igem Alkohol, bis keine Farbe mehr abgeht; 6. abwaschen mit Wasser bei Reinkultur: trocknen, Balsam. Bei Sputum: 7. nachfärben mit dünner Malachitgrünlösung einige Sekunden (man hält sich Malachitgrünlösung vorrätig, die in gleicher Weise wie *Löfflers* Methylenblau hergestellt ist. Hiervon gibt man 1 Tropfen auf das mit Wasser bedeckte Deckglas); 8. trocknen, Balsam.

Die säurefesten Bakterien sind rot, die Körnchen blau bis blauschwarz. Andere Bakterien hellgrün. Die Perlsuchtbacillen zeigen die schwarzblauen Körnchen in blaßroter Hülle und sind sehr groß.

Die Methode bietet keinerlei besondere Vorteile, bei Nachprüfungen hat sie zum Teil versagt.

Bei einer weiteren Methode zur Darstellung der Granula in Tuberkelbacillen bedient sich *v. Betegh* der Beizung mit 10%iger Silbernitratlösung und nachfolgender Einwirkung einer 50%igen Rodinallösung. Granula schwarzbraun, Bacillen nicht oder schwach bräunlich gefärbt.

v. Beteghs Modifikation des *Gram*-Verfahrens.

Lösung: 2 g Dahlia in 20 cm³ 95%igem Äthylalkohol. Hierzu 50 cm³ destilliertes Wasser und 4—5 Tropfen konzentrierte Carbollösung, schütteln, filtrieren.

1. Dünne Ausstriche lufttrocken in Flamme fixieren; 2. 2—5 Minuten färben mit Dahliälösung bei Zimmertemperatur; 3. Wasserspülen; 4. Jodjodkalium (Jod 1, Jodkali 2, Wasser 100) einige Sekunden;

5. differenzieren in absolutem Alkohol; 6. Wasserspülen, trocknen, Balsam.

Differenziert man 5—10 Minuten mit Alkohol oder Alkoholacetone, so ist die Hülle der Tuberkelbacillen ganz blaß, die Granula sind intensiv gefärbt. Um einen Kontrast zu haben, kann man mit einer Färbung mit Carbolfuchsin unter mehrmaligem Erwärmen (ohne kochen zu lassen) beginnen, dann 2. Wasserspülen; 3. Dahliafärbung 2—3 Minuten, kalt; 4. Wasserspülen; 5. Jodjodkalium 10—15 Minuten; 6. differenzieren in Alkoholacetone (bei Reinkulturen aa, bei Ausgangsmaterial 2:1), bis keine Farbe abgeht; 7. Wasserspülen; 8. kontrastfärben mit 1%iger wässriger Pikrinsäurelösung oder Malachitgrünlösung einige Sekunden; 9. Wasserspülen, trocknen, Balsam.

Körnchen schwarz, Hülle rot. Gewebegrundton gelb oder grün.

Ishiwara gibt eine Modifikation der *Gram*-Färbung zur Darstellung der Granula des Tuberkelbacillus an:

1. Aufkochen über der Flamme mit einer Lösung von Petroläther-wassercarbolgentianaviolett ($\frac{1}{4}$ Carbolgentianaviolettlösung auf $\frac{3}{4}$ Petrolätherwasser); 2. 5 Minuten lange Einwirkung von Jodjodkaliumlösung; 3. 10 Sekunden entfärben in 3%iger Salzsäure; 4. abspülen in Acetonalkohol aa, bis kein Farbstoff mehr abfließt; 5. gegenfärben mit 2%iger Safraninlösung.

Verfahren von *Kronberger*.

1. Vorsichtiges Erhitzen beim Fixieren; 2. färben mit Carbolfuchsin bis zur ersten Dampfentwicklung unter vorsichtigem Erwärmen; 3. Entfärbung in 15%iger Salpetersäure; 4. abspülen mit 60%igem Alkohol; 5. Jodtinktur mit 4facher Menge 60%igen Alkohols einige Sekunden; 6. sorgfältig abspülen, trocknen.

Tuberkelbacillen blaßrosa oder rot, selten ungefärbt, mit schwarz-roten Körnchen. Andere Bakterien und Gewebe ungefärbt oder blaß-gelb. Die Beurteilung der Präparate erfordert einige Übung, sie ist schwieriger als bei der *Ziehl-Neelsen*-Färbung (vgl. *W. Rosenthal*).

Kirchenstein läßt bei der *Kronbergerschen* Methode die Granula noch dadurch schärfer hervortreten, daß er nach der Jodbehandlung Osmiumdämpfe einwirken läßt (10—15 Sekunden). Ferner verwendet er eine alkoholische Jodjodkaliumlösung, die mit 80%igem Alkohol hergestellt ist (100 cm³ 80%iger Alkohol + 2.5 Jod + 1.25 Jodkali).

Er empfiehlt eine *Pikrinosmiumjodmethode*:

a) Pikrinmethode.

1. Dünnes Ausstreichen des Untersuchungsmaterials; 2. vorsichtig fixieren in der Flamme; 3. erwärmen des aufgegossenen Carbolfuchsin bis zur Dampfentwicklung; 4. abkühlen lassen; 5. aufgießen von Pikrinsäurealkohol (*Esbachs* Reagens aa Alkohol abs.); 6. entfärben mit

15%iger Salpetersäure und waschen in 7. 60%igem Alkohol; 8. aufgießen von Pikrinsäurealkohol; 9. sorgfältig abspülen; 10. trocknen mit Fließpapier und über der Flamme.

b) Jodosmiummethode.

1. Pikrinpräparat 20—30 Sekunden behandeln mit alkohol. Jodlösung (s. oben); 2. Jodlösung abgießen, ohne abtrocknen 10—15 Sekunden den Dämpfen einer 0.5—1%igen Osmiumsäure aussetzen; 3. 2—3 Minuten in fließendem Wasser spülen; 4. trocknen u. s. w.

Körner in Tuberkelbacillen sieht man regelmäßig, wenn man das *Ziehl*-Präparat nach der Entfärbung durch Säure in Wasser legt und einige Zeit darin liegen läßt (*E. Fitschen*). Als Säure ist z. B. 10%ige Salzsäure bei $\frac{1}{2}$ Minute langer Einwirkung oder 3%iger Salzsäurealkohol bei 1 Minute langer Einwirkung brauchbar. Die Dauer der Einwirkung von Wasser soll 2 Minuten (oder mehr) betragen.

Differenzierungsmethoden.

C. Spenglers Methode zur Unterscheidung von Perlsucht- und Tuberkelbacillen.

Hüllenfärbung.

1. Ausstrichmaterial alkalisieren mit ganz geringem Quantum (1%) Kali- oder Natronlauge, Herstellung des Trockenpräparates unter sehr schonender Erwärmung; 2. übergießen mit *Löffler-Blau*, Wasserspülen; 3. Carbolfuchsin unter gelinder Erwärmung bis zu schwacher Dampfbildung, Wasserspülen; 4. Methylenblauachfärbung unter langsamem Zusatz von 1—2 gtt. 15%iger Salpetersäure zum Methylenblau. Einwirkungsdauer einige Sekunden; 5. Wasserspülen, trocknen.

Perlsuchtbacillen sehr vergrößert (Hüllenfärbung).

Unterscheidung von Tuberkel- und Leprabacillen.

Baumgartens Verfahren.

1. Kalt färben in Fuchsinlösung (5 Tropfen gesättigte alkoholische Lösung zu 5 cm^3 Aqua dest.) 5—7 Minuten; 2. entfärben $\frac{1}{4}$ Minute in einer Mischung von 10 Teilen Alkohol und 1 Teil Salpetersäure; 3. abspülen in Wasser; 4. nachfärben mit dünner Methylenblaulösung.

Die Leprabacillen sind gefärbt, die Tuberkelbacillen ungefärbt.

Methode *Schäffer*.

Vorbehandlung mit 5%iger Schwefelsäure, dann *Ziehl*-Färbung: Die Tuberkelbacillen sind widerstandsfähiger als die Leprabacillen.

Babes.

Mit Anilinsafranin, Jodjodkalium, Alkohol, Methylenblau färben sich die Leprabacillen, Tuberkelbacillen jedoch nur schwach oder nicht.

Die übereinstimmende Meinung ist, daß die tinktoriellen Differenzierungsmethoden zwischen Lepra- und Tuberkelbacillen nur bedingten Wert haben, es finden sich quantitative Differenzen, die aber diagnostisch nur mit Vorsicht zu verwerten sind, da sowohl die Leprabacillen als die Tuberkelbacillen selbst sich nicht in gleicher Weise bei den verschiedenen Färbeverfahren verhalten.

Silberimprägnierung von Tuberkelbacillen nach Yamamoto.

a) Für Tuberkelbacillen (Sputum, Kultur). Bei Kulturbacillen ist Wasser als Aufschwemmungsmittel zu vermeiden. Man gibt 1%iges Hühnereiweiß auf das Deckglas und breitet dann die Tuberkelbacillen zu dünner Schicht aus;

b) für Leprabacillen ist Beimischung von Blut möglichst zu vermeiden: man ruft eine lokale Anämie durch Fixieren des Lepraknotens zwischen Daumen und Zeigefinger hervor und schabt mit scharfem Messer Lymphsaft aus dem tieferen Schichten.

Imprägnierung: 1. Die luftgetrockneten Präparate werden vorsichtig in der Flamme fixiert; 2. 10 Minuten langes Erwärmen in 5%igem Silbernitrat bei 55—60°; 3. 5 Minuten lang reduzieren in Acid. pyrogall. 2·0, Ac. tannic. 1·0, Aqua dest. ad 100·0; 4. entfernen des schwarzen Niederschlages vorsichtig durch mit Wasser angefeuchtetes Fließpapier; 5. trocknen, Balsam.

Tuberkelbacillen tiefschwarz, im goldbraunen Grunde, Leprabacillen hell, durchsichtig (sie können mit Ziehl'schem Carbofuchsin unter Säurealkoholbehandlung nachgefärbt werden).

Die Methode hat nur Aussicht auf Erfolg, wenn die Präparate sehr dünn und gleichmäßig ausgestrichen sind, trotzdem entstehen leicht Niederschläge.

Unterscheidung von Tuberkel- und Smegmabacillen.

1. Methode von Bunge und Trautenroth.

1. Einlegen der Präparate zur Entfettung 3 Stunden lang in Alcohol abs., darnach 2. 15 Minuten in 5%ige Chromsäure, Wasserspülen; 3. übliche Färbung mit konzentriertem Carbofuchsin; 4. Entfärbung 3 Minuten in verdünnter Schwefelsäure; 5. Nachfärbung und definitive Entfärbung in Weichselbaums konzentriertem alkoholischen Methylenblau nicht unter 5 Minuten.

Tuberkelbacillen rot, Smegmabacillen blau.

2. Methode von Honsell.

1. Färben mit Carbofuchsin 2 Minuten unter Kochen; 2. abspülen mit Wasser, trocknen; 3. entfärben 10 Minuten in Mischung von 3 Teilen Salzsäure mit 97 Teilen absolutem Alkohol; 4. nachfärben mit gesättigter

alkoholischer Methylenblaulösung zur Hälfte mit Wasser verdünnt;
5. Wasserspülen, trocknen.

Tuberkelbacillen rot, Smegmabacillen blau.

3. nach *Pappenheim*, s. S. 313.

4. nach *Malowan*, s. S. 314.

Literatur: *Argutinsky P.*, A. f. mikrosk. Anat., LXI, S. 331. — *Babes V.*, Zt. f. Hyg. 1889, V, S. 173; ebenda 1895, XX. — *Baumgarten*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1884, I, S. 367. — *Bender W.*, Zbl. f. Bakt. 1921, Orig. LXXXVI, S. 461. — *Berger*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1910, Orig. LIII, S. 174. — *Berka*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LI, S. 456. — *v. Betegh L.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. XLVII, H. 5; ebenda XLIX, S. 461; LII, S. 550. — *Blumenthal J. M.* u. *Lipskerow M.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1905, Orig. XXXVIII, S. 359. — *Böhm J.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LXII, S. 497. — *Boit*, M. med. Woch. 1916, S. 852; Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1916, XXXVI, S. 227. — *Bunge u. Trautenroth*, Fortschr. d. Med. 1896, XIV. — *Caan A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. XLIX, S. 637. — *Carpintero A. G.*, *Mayoral*, *Gamero*, *Augusto G. y Lobo R.*, Revista Valenc. de Cienc. med. 1914, XVI, S. 102; Ref. Zbl. f. Bakt.; Ref. LXIV, S. 46. — *Claudius*, Ann. Pasteur 1897, XI, S. 332. — *Coles*, Brit. med. j. 1899. — *Czaplewski E.*, Zbl. f. Bakt. 1890, VIII, S. 685; Die Untersuchung des Auswurfs auf Tuberkelbacillen. Jena 1891; Hyg. Rundschau 1894, IV; Arb. a. d. Path. Inst. Tübingen 1908, VI. — *Dietrich A. u. Liebermeister G.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1902, XXXII, S. 858. — *Ehrlich*, Zt. f. kl. Med. 1880, I, S. 556; D. med. Woch. 1882, S. 270. — *Eisenberg Ph.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Orig. XLVII, S. 415; 1909, XLVIII, S. 257; 1909, XLIX, S. 465; 1909, LI, S. 115; 1910, LIII, S. 551; LVI, S. 193. — *Epstein E.*, A. f. Hyg. 1921, XL, S. 136. — *Epstein*, New York Soc. 1905, V, p. 4, zit. bei *Hamm*; J. of inf. dis. 1906, III, p. 770. — *van Ermenghem*, Travaux du Lab. d'Hyg. et de Bact. de l'Univ. de Gand. T. I, Fasc. 3; Ref. Zbl. f. Bakt. XV, S. 969. — *Ernst P.*, Zt. f. Hyg. 1888, IV, S. 25; ebenda 1889, V, S. 428. — *Falières*, Diss. 1902, zit. bei *Blumenthal u. Lipskerow*. — *Feeser A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1912, Orig. LXVI, S. 137. — *Ficker M.*, Zt. f. Hyg. 1898, XXIX, S. 15; Hyg. Rundschau 1902, S. 1131; A. f. Hyg. XLVI, S. 171. — *Fitschen E.*, Zt. f. Tuberk., XXVIII, S. 29. — *Fontes A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, XLIX, H. 3. — *Fraenkel B.*, Berl. klin. Woch. 1884, Nr. 13. — *Fraenkel E.*, D. med. Woch. 1885, S. 576. — *Fraenkel E. u. Pielsticker F.*, Zt. f. Hyg. 1909, LXIV, S. 145. — *Frei W.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LXI, S. 411. — *Friedberger E.*, M. med. Woch. 1916, Nr. 47, S. 1675. — *Frosch P.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LXIV, S. 118. — *Gaffky*, *Pfeiffer R.* u. s. w., Bericht über die Tätigkeit der Pestkommission. Arb. a. d. kais. Ges. 1899, XVI. — *Galli u. Valerio*, Zbl. f. Bakt. 1903, XXXIII, S. 239; ebenda, XXXV, S. 83; ebenda, LXXIX, S. 47. — *Gans O.*, Derm. Woch. 1919, LXIX, S. 491. — *Gasis D.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. L, S. 111; Berl. kl. Woch. 1909, Nr. 18; ebenda 1910, Nr. 31. — *Gins H.*, D. med. Woch. 1913, Nr. 11, S. 502. — *Gotschlich E.*, Zt. f. Hyg. 1900, XXXV, S. 234. — *Gram Chr.*, Fortschr. d. Med. 1884, Nr. 6, S. 185. — *Grimme A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1902, XXXII, S. 1. — *Günther C.*, Einführung in das Studium der Bakteriologie 1898; D. med. Woch. 1887, Nr. 22, S. 474. — *Ham*, zit. nach *Ehrlich*, Enzykl. d. mikrosk. Technik. 2. Aufl., 1910, bei Gonokokken. — *Hamm A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. XLIII, S. 287. — *Hatano S.*, Berl. kl. Woch. 1909, S. 1694. — *Herman*, Ann. de l'Inst. Past. 1889, S. 160; ferner ebenda 1908, S. 92. — *Hombberger E.*, Zbl. f. Bakt. 1900, XXVII, S. 533. — *Honsell B.*, Baumgartens Jahresber., XCVI, S. 397. — *Ishiwara T.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LXVIII, S. 113. — *Jadasohn*, Gonorrhöe im Handb. d. Geschlechtskrankh. I. Alfr. Hölder, Wien u. Leipzig 1910. — *Jensen V.*, Berl. kl. Woch. 1912, Nr. 35, S. 1663. — *Jötten K. W.* u. *Haarmann P.*, M. med. Woch. 1920, Nr. 24, S. 692. — *Kayser H.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1901, Orig. LV, S. 91. — *Kindborg E.*, Zbl. f. Bakt., Orig. LXXX, S. 188. —

- Kirchenstein A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LXVI, S. 144. — *Kißkalt C.*, Zbl. f. Bakt., XXX, S. 281. — *Klein*, zit. bei *Finger*, Die Blennorrhöe. 4. Aufl., 1896, S. 19. — *Koch R.*, Cohns Beitr. z. Biologie d. Pflanzen 1877, II, S. 401; Mitt. a. d. kais. Ges. 1881, I, S. 5; ebenda 1884, II. — *Kongsted E.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1920, Orig. LXXXIV, S. 513. — *Kossel H.* u. *Overbeck*, Arb. a. d. kais. Ges. 1901, XVIII. — *Krantz W.*, M. med. Woch. 1921, Nr. 8, S. 240. — *Kronberger*, Brauers Beiträge zur Tuberkulose, XVI, H. 2. — *Krystalowicz*, Monatsh. f. prakt. Derm., XXXVI, S. 302. — *Kühne H.*, Zbl. f. Bakt. 1890, VIII, S. 293. — *Kutscher*, Zt. f. Hyg. 1894, XVIII, S. 339. — *Langer H.* u. *Krüger H.*, D. med. Woch. 1916, Nr. 24, S. 722. — *Langer H.*, M. med. Woch. 1916, Nr. 38, S. 1373. — *Lanz A.*, D. med. Woch. 1894, S. 200; ebenda 1898, S. 637. — *Lenhartz*, M. med. Woch. 1897, Nr. 47. — *v. Leszczynski*, A. f. Dermat. 1904, LXXI, H. 2/3. — *Loeb H.*, Dermat. Zt. 1917, S. 646. — *Löffler F.*, Mitt. a. d. kais. Ges. 1884, II, S. 439; Zbl. f. Bakt. 1889, VI, S. 209; 1890, VII; D. med. Woch. 1907, Nr. 5; Arb. a. d. kais. Ges. I, S. 141. — *Lübimoff N.*, Zbl. f. Bakt. 1888, III, S. 540. — *Macalister G. K. H.*, Brit. med. j., CXII, S. 411. — *Malowan S. L.*, Wr. kl. Woch. 1919, S. 982. — *Marx E.*, Zbl. f. Bakt., XXIX, S. 11; M. med. Woch. 1919, S. 416. — *Meyer A.*, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. G. Fischer, Jena 1903; Die Zelle der Bakterien. G. Fischer, Jena 1912. — *Much H.*, Beitr. z. Klin. d. Tuberk., VIII, H. 1. — *Müller A.*, Zbl. f. Bakt. 1901, XXIX. — *Neelsen*, Fortschr. d. Med. 1885, S. 200 (bei *Johne*). — *Neide E.*, Zbl. f. Bakt. 1904, Orig. XXXV, S. 508. — *Neisser A.*, Zt. f. Hyg. 1888, IV, S. 165; Berl. kl. Woch. 1918, Nr. 28, S. 765. — *Neisser M.*, Hyg. Rundschau 1903, Nr. 14; Zt. f. Hyg., XXIV, S. 443. — *Pappenheim A.*, Monatsh. f. prakt. Derm., XXXIX, S. 361; zit. nach *Ehrlich*, Enzyklop. d. mikrosk. Technik. 2. Aufl., 1910 (bei *Gonokokken*); Berl. kl. Woch. 1898, S. 809. — *Peck W.*, The Lancet 1903, S. 92. — *Peltriset*, Bull. des Sc. Pharm. 1903, T. 8. — *Pick u. Jacobsohn*, Berl. kl. Woch. 1896, S. 811. — *Piorkowski*, Sitzung d. Berl. med. Ges. 1900, 19. Dez. — *Pitfield*, The Univers. of Pennsylvania med. Bull. Sept. 1900, S. 177. — *Pranus*, M. med. Woch. 1919, Nr. 20, S. 546. — *Raskin M.*, D. med. Woch. 1911, S. 2384. — *Rondelli u. Buscaroni*, Zbl. f. Bakt. 1897, S. 21, 70. — *Rosenblat S.*, M. med. Woch. 1909, Nr. 49, S. 2521; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1911, Orig. LVIII, S. 173. — *Rosenthal W.*, M. med. Woch. 1918, S. 1282. — *Roux*, zit. nach *M. Neisser u. Gins* in *Kolle-Wassermann*. 2. Aufl., V, S. 945. — *de Roovaart*, Zbl. f. Bakt., XXIX, S. 575. — *Saathoff*, D. med. Woch. 1905, Nr. 51. — *Schäffer*, 5. Kongr. d. Dermat. Ges. Graz 1895; zit. nach *Kolle-Wassermann* 1912, IV, S. 665. — *Schauffler W. G.*, Zbl. f. Bakt., XXXII, S. 212. — *Scheller*, im Lehrbuch der Mikrobiologie von *Friedberger u. Pfeiffer*. Jena 1919. — *Schütz C.*, M. med. Woch. 1889, Nr. 14. — *Schutte-Tigges H.*, D. med. Woch. 1920, Nr. 44, S. 1225. — *v. Sehlen*, Verh. d. D. Dermat. Ges. IV. Kongreß 1894, S. 167. — *de Seixas Palma J.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LXXXIII, S. 507. — *Sommerfeld P.*, D. med. Woch. 1910, Nr. 11, S. 505. — *Spengler C.*, D. med. Woch. 1907, Nr. 9, S. 337; Mitt. a. d. Inst. Dr. K. Spengler in Davos 1919, I, H. 1. — *Tarchetti*, Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., Ref. XXXV, S. 410. — *Telemann*, D. med. Woch. 1910, S. 891. — *Thim J. R.*, Dermat. Woch. 1920, LXX, S. 74. — *Trincas L.*, Giorn. R. soc. Ital. d'igiene 1907; Ref. Zbl. f. Bakt. 1909, Ref. XLII. — *Ulrichs B.*, D. med. Woch. 1919, S. 468. — *Unna*, Monatsh. f. prakt. Derm. 1887, Erg.-Heft 1. — *Vincent M. H.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1894, XVI. — *v. Wahl A.*, Zbl. f. Bakt. 1903, XXXIII, S. 239. — *Walter E.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LXIV, S. 136. — *Wehrli u. Knoll*, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. 1909, XIV, S. 135. — *Weichselbaum*, Grundriß der pathologischen Histologie. Wien 1892. — *Weidenreich*, Fol. haemat. 1906, III, S. 242. — *Weigert C.*, Schles. Ges. f. vaterl. Kultur. Breslau, 10. Dez. 1875, Jahresber., S. 229. — *Weinrich M.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1898, XXIV, S. 258. — *Weiß L.*, M. med. Woch. 1909, S. 443; Berl. kl. Woch. 1909, S. 1797. — *Weiß M.*, Zt. f. Tuberk. 1919, XXX, S. 330. — *v. Wendt G.*, Zbl. f. Bakt. 1902, Orig. XXXI, Nr. 13. — *Yamamoto*, Zbl. f. Bakt. 1908, XLVII, S. 570. — *Ziehl*, D. med. Woch. 1882, S. 451.

Methoden der Geißel-, Kapsel- und Sporenfärbung.

Prof. Dr. med. **Martin Ficker**, Berlin-Dahlem.

Mit 1 Textabbildung.

Geißelfärbung.

I. Geschichtliches.

R. Koch (a, S. 404, 416 ff.) hat zum ersten Male die Geißeln von Bakterien färberisch dargestellt. Er berichtet 1877, daß er mit allen ihm zugänglichen Anilinfarben versucht habe, Geißeln zu färben, aber nie eine Andeutung bekommen habe. Erst mit *Pikrinsäure* gelang es ihm, Geißeln etwas deutlicher zu machen. Zuletzt wandte er *Pflanzenextrakte* an und beobachtete, daß mit einer konzentrierten wässerigen Lösung von *Extractum campechianum*, der zur Verhütung von Schimmelbildung etwas *Campher* zugesetzt war, gute Färbungen von Geißeln zu erzielen waren. Ein Mangel ergab sich insofern, als die Farbe durch Einschlußmittel sehr bald wieder ausgezogen wurde. Er vermied das dadurch, daß er das Deckglas nach Färbung mit *Extr. campech.* in eine schwache *Chromsäurelösung* oder in *Müllersche Flüssigkeit* brachte, es bildete sich eine braunschwarz gefärbte unlösliche Verbindung des *Extr. campech.* mit *Chrom*.

Mit dieser Methode gelang aber die Geißelfärbung nur bei einigen größeren Bakterienarten. Auch *Neuhaß* kam mit seiner Methode (fünf Minuten langes Kochen der Trockenpräparate auf Kaisertinte, dann 15 Minuten langes Einlegen in schwach erwärmte Lösung von neutralem chromsauren Natron und 2—3malige Wiederholung des ganzen Vorganges) nicht viel weiter.

Erst durch Anwendung von Beizen gelang es *F. Löffler* (a) 1889, die Geißeln allgemein darstellbar zu machen. *Löffler* hatte ein Trockenpräparat von faulendem Flußwasser nach der Fixation mit Tinte (tief-schwarze Gallustinte von *Leonhardi*, Dresden) unter leichtem Erwärmen über der Flamme behandelt, mit destilliertem Wasser abgespült und dann mit schwach alkalischem Anilinwassermethylviolett unter schwachem Erwärmen gefärbt; hierbei konnte er bei fast allen Bakterien des Präparates Geißeln beobachten. Er fand dann, daß Tannin, namentlich die Campecheholzabkochung sich zur Beizung eignete. Besser als Tannin wirkte die Ferroverbindung des Tannins. Er stellte die Beize

wie folgt her: zu 10 cm^3 einer 20%igen wässerigen Tanninlösung gab er soviel Tropfen einer wässerigen Ferrosulfatlösung, daß die ganze Flüssigkeit schwarzviolett wurde. Hierzu 3—4 cm^3 einer Campecheholzabkochung (1 Teil Holz auf 8 Teile Wasser).

II. Technik der Geißelfärbung.

Wer mit Geißelfärbungen Erfahrungen gesammelt hat, weiß, daß die Präparierung der Geißeln meist schwieriger ist als die eigentliche Färbung.

Von den der Färbung bzw. Beizung vorausgehenden Maßnahmen sind die wichtigsten:

1. Verwendung absolut sauberer Deckgläser.

Geeignete Verfahren s. S. 269.

Vor jeder Geißelfärbung prüfe man jedes einzelne der zu benutzenden Deckgläser. Ein mittels Öse aufgebrachtes Wassertröpfchen muß sich flach ausbreiten.

Einen Anfänger lasse man erst einmal alle Manipulationen, die zu der betreffenden Geißelfärbemethode gehören, mit einem unbeschickten Deckglas vornehmen. Man wird erstaunt sein, was sich dann alles auf dem Deckglas färbt, wenn es nicht besonders vorbereitet wurde. Die organischen Substanzen des mangelhaft gereinigten Glases reagieren eben auch auf Beize und Färbung, so daß mehr oder weniger dicke Schleier und Niederschläge in die Erscheinung treten. Ebenso wie diese an und für sich am Glas haftenden Unreinlichkeiten, so haben auch Nährbodenbestandteile nach erfolgter Beizung eine größere Affinität zur Farbe als die Geißeln selbst, denen also Beize und Farbe entzogen wird, wie ja auch meist an den niederschlagsreichen Stellen der Geißelpräparate die Geißeln ungefärbt oder nur schwach gefärbt bleiben.

2. Verwendung geeigneter Kulturen.

Man überzeuge sich im hängenden Tropfen von der Beweglichkeit der zu färbenden Bakterien, dabei sind sie in dem gleichen Wasser, wie es bei der Suspendierung für die Geißelfärbung verwendet wird, aufzuschwimmen.

Zur Vermeidung von Niederschlägen werden allgemein nicht flüssige, sondern feste Nährböden, in der Regel junge Agarstrichkulturen von 12—20 Stunden benutzt, die Formen müssen im Vollbesitze ihrer Beweglichkeit sein. Man darf sich aber nicht schematisch an dies Stundenalter halten, weil die Beweglichkeit vom Nährboden, von der Art der Bakterien, von der Eigenart des Stammes u. s. f. abhängig ist. Wenn man im Anfang den jungen Kulturen den Vorzug gibt, so sind doch auch mehrtägige und ältere Kulturen unter Umständen brauchbar, namentlich wenn sie bei mittleren oder niederen Temperaturen gezüchtet sind. Die Erfahrung zeigt, daß dann sogar der Geißelapparat die Färbung leichter anzunehmen pflegt und daß die Geißeln kräftiger

entwickelt sind. Es sind aber eben in älteren Kulturen mehr Niederschläge (Intercellularsubstanzen u. s. w.), mehr abgeworfene Geißeln u. a. zu erwarten.

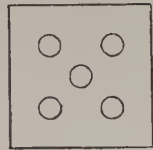
3. Geeignete Präparation.

a) Bei jähem Wechsel der Salzkonzentration kann leicht Schädigung der Geißeln eintreten. Man wird daher bei Übertragung von dem salzhaltigen festen Nährboden in destilliertes Wasser oft ungenügende Bilder erhalten, besser eignet sich Leitungswasser zum Suspendieren. Hierin muß man den Geißeln Gelegenheit geben sich zu entfalten.

b) Auch jähe Temperaturwechsel sollen vermieden werden, bei empfindlichen Keimarten wird man die Kulturen nach Herausnahme aus dem Brutschrank erst einige Stunden im Zimmer stehen lassen und zimmerwarmes Wasser verwenden.

c) Eine fast selbstverständliche Forderung ist, nicht zu große Bakterienmengen zu nehmen: Die Geißellänge übertrifft die der Bakterien oft um ein Mehrfaches. Will man sie darstellen, so müssen sie eben vorerst Platz zur Entfaltung haben. Ich pflege so vorzugehen, daß ich auf einen reinen Objektträger (der in einer Petrischale liegt, die Innenseite der Oberschale trägt ein Stück angefeuchtetes Fließpapier, so daß man eine feuchte Kammer hat) mit großer Öse zwei getrennte Tropfen Leitungswasser I und II gebe. Der erste wird mit einer Nadelspitze Kultur aus dem unteren Teil des Schrägagarröhrchens so geimpft, daß das Material des Tropfens grau getrübt erscheint. Tropfen II erhält aus I mittels Öse soviel Material, daß er gerade anfängt beim Aufblicken gegen dunklen Hintergrund einen ganz leichten grauen Hauch zu zeigen. Von Tropfen II wird hängender Tropfen hergestellt. Während der Besichtigungszeit bleiben Tropfen I und II in der feuchten Kammer. Sind die Bakterien gut beweglich, so wird das Material auf vorher unter Staubschutz (Glasglocke, Glasschale) bereitgehaltene Deckgläser aufgebracht. (Ergibt die Besichtigung, daß die Aufschwemmung in Tropfen II zu dicht ist, so wird ein III. Tropfen auf den Objektträger aufgebracht und mit kleiner Öse aus Tropfen II beschickt.) Man kann das Material auf das Deckglas in Schlangen- oder Spirallinien verteilen. Ich pflege 5 sehr kleine Ösen auf das Deckglas in Geldbriefsiegel-form zu geben, die kleinen Tropfen trocknen schnell ein, die Trocknungs-ränder ermöglichen ein rasches Auffinden der Bakterien, wenn man sie nach der Färbung mit schwacher Vergrößerung aufsucht, während bei anderen Präparationen einmal durch Verstreichen Schädigungen des Geißelapparates eintreten können und dann auch das Auffinden der in relativ geringer Zahl auf das Deckglas ausgestrichenen Bakterien Schwierigkeiten bietet.

Fig. 119.



Es ist Wert darauf zu legen, daß das Material schnell trocknet, „unter der Nadel“, insofern ist das Verstreichen einer sehr kleinen Öse Material sehr zweckmäßig. Wählt man das Auftragen von kleinsten Tröpfchen, so empfiehlt es sich, das Deckglas in die Nähe der Bunsenflamme zu bringen, nicht damit es erwärmt wird (das ist zu vermeiden), sondern damit durch den vorbeistreifenden Luftstrom die Trocknung beschleunigt wird.

4. Fixation.

Für gewöhnlich fixiert man in der Weise, daß man das eben luft-trocken gewordene Präparat mit Fingern faßt und zweimal durch die nichtleuchtende Bunsenflamme zieht. Unter allen Umständen ist zu starkes Erhitzen zu vermeiden. Geeignet ist auch die Fixation durch Annäherung eines warmen Objektträgers (s. S. 278). *A. Meyer* kommt damit aus, daß er die trockenen Präparate 5 Minuten bei 40—50° hält.

Eine systematische Untersuchung der für Geißeldarstellung geeigneten sonstigen Fixationsverfahren steht noch aus. Lediglich die *Osmiumfixation* hat bei der Geißeldarstellung eine gewisse Verbreitung gefunden. Man handhabt sie für gewöhnlich so, daß man zu dem oben erwähnten Tropfen II der Bakteriensuspension 1—2 Ösen einer 2%igen Osmiumsäurelösung zusetzt und dann wie oben geschildert weiter verfährt; oder man behandelt nach dem Vorgang von *van Ermengem* die Präparate gleichzeitig mit der Beize auch mit Osmiumsäure (s. S. 338).

Das Wichtigste für die Handhabung bei Beizung und Färbung ist bei den einzelnen Methoden erwähnt. Hier sei noch darauf hingewiesen, daß bei Geißelfärbungen besonders störend die Verdunstungsränder wirken, die dann entstehen, wenn die Deckgläser oder Objektträger mit der Beize oder Farbe nicht völlig bis zu den Rändern bedeckt werden. Würde man so lange Wasser spülen, bis diese Verdunstungsränder sich entfärben, so würde die Gefahr bestehen, daß auch die Bakterienfärbung zurückgeht oder daß das Material weggeschwemmt wird. Man tropft daher von der Beize oder Farbe soviel auf die Präparate, bis diese Lösungen das ganze Glas bedecken, oder aber besser man beizt und färbt in Schälchen, wobei man die Deckgläser mit der beladenen Seite nach unten auf den Lösungen schwimmen läßt.

Bei allen Methoden ist das Trocknen zwischen Fließpapier möglichst zu meiden: Nach dem Wasserspülen läßt man das Wasser spontan ablaufen, indem man das Deckglas auf eine Fließpapierunterlage mit der Kante stellt und an irgend einen Gegenstand anlehnt, man kann auch mit Fließpapier von den Rändern her das Wasser absaugen, auch abschütteln oder wegblasen mit dem Mund oder mit Gummigebläse (sehr empfehlenswert).

Darstellung der Geißeln.

Von Färbemethoden empfehle ich in erster Linie die Methode von *Peppler* (S. 335), in zweiter Linie die von *Löffler* in der Fassung S. 334.

Von den Methoden der Darstellung durch Silbersalze ist die *Zettnowsche* am einfachsten und sichersten.

A. Färbemethoden.

Löfflers Geißelfärbung (*Löffler*, a, b).

1. Trockenpräparat dreimal durch die Flamme ziehen (unter Vermeidung zu starken Erwärmens); 2. beizen $\frac{1}{2}$ —1 Minute unter Erwärmen bis zur Dampfbildung (Beize s. unten); 3. abspülen mit kräftigem Wasserstrahl. Sorgfältiges Entfernen der Beize an den Rändern und auf der Fläche; 4. Alkoholspülen zur Entfernung aller Niederschläge (nur die Bakterien dürfen gebeizt erscheinen); 5. färben unter Erwärmen mit Anilinwasserfuchsin (hergestellt wie üblich, aber durch Zusatz von 1 % iger NaOH — auf 100 cm^3 Farbe 1 cm^3 Lauge — alkalisch gemacht, man darf auch etwas mehr NaOH zugeben, u. zw. soviel, als bis zur Erzeugung der Schwebefällung — eben beginnende Trübung der Farblösung — erforderlich ist). Die Lösung ist stets frisch herzustellen; 6. abspülen in Wasser, trocknen, einschließen.

1890 empfahl *Löffler* folgende Beize:

Löffler-Beize.

10 cm^3 einer 20 % igen Tanninlösung werden vermischt mit 5 cm^3 kalt gesättigter wässriger Lösung von Ferrosulfat (Eisenvitriol) oder Ferr. oxydul. ammon., hierzu 1 cm^3 wässriger oder alkoholisch gesättigter Fuchsin- (oder Methylviolett- oder Wollschwarz-) Lösung.

Die Beize ist nach Umschütteln sofort gebrauchsfertig und hält sich monatelang.

Nach *Löffler* ist diese Beize gerade richtig für *Spirillum concentricum*. Für andere Bakterien ist die Beize alkalischer oder saurer zu machen, u. zw. ist für *Typhusbacillen* ein Zusatz von 20—22 Tropfen = 1 cm^3 1 % iger NaOH auf 16 cm^3 Beize, für *Subtilis* 28—30 Tropfen, für *Mal. Ödem* 36—37 Tropfen, für *Pyocyaneus* 5—6 Tropfen erforderlich. Für *Cholera* bedürfen die 16 cm^3 Beize eines Zusatzes von $\frac{1}{2}$ —1 Tropfen, für *Spir. rubrum* 9 Tropfen einer auf die 1 % ige Natronlösung eingestellten Schwefelsäure.

Diese Vorschrift wird heute kaum mehr befolgt. Zunächst ist erwiesen, daß der Alkali- oder Säurezusatz zur Beize überflüssig ist, das Nichtgelingen der Präparate hat andere Ursachen. Anstatt dessen empfehlen manche Autoren (*Nicollé* und *Morax*) die Beizung mehrmals unter Erwärmen vorzunehmen, u. zw. 3—4mal je 10 Sekunden bis zur Bildung von Dampf (nicht stärker), zwischen zwei Beizungen ist sorgfältig mit Wasser zu spülen. Andere empfehlen die Beizung auf 2—4 Minuten auszudehnen.

Ferner kann man das Alkoholspülen (4) fortlassen. Für die eigentliche Färbung ist frisches Anilinwasserfuchsin oder Anilinwassergentianaviolett ohne besonderen Alkalizusatz zu empfehlen, aber ebenso gut konzentriertes Carbofuchsin oder besser, weil weniger Niederschläge gebend, das übliche alkoholisch-wässrige Fuchsin. *Günther* empfiehlt dabei mäßiges Erwärmen bis zur beginnenden Dampfbildung und läßt dann noch die warme Farbe 1 Minute einwirken.

Ich empfehle, die *Löfflersche Methode* wie folgt anzuwenden:

1. Fixieren wie üblich, oder besser nur zweimal durch die Flamme ziehen;
2. auftropfen der *Löfflerschen* Beize, 1 Minute einwirken lassen, allenfalls ganz leicht erwärmen;
3. sehr sorgfältig Beize unter dünnem Strahl der Wasserleitung auswaschen. Die Reste des Wassers ablaufen lassen, vom Rande her mit Fließpapier absaugen und durch Anblasen entfernen;
4. auftropfen von frischem Anilinwasserfuchsin oder konzentriertem Carbofuchsin oder alkoholisch wässrigem Fuchsin unter ganz leichtem Erwärmen, 3—4 Minuten lang;
5. reichlich Wasserspülen. Wasser ablaufen lassen, absaugen vom Rande her, trocknen hoch über der Flamme, einschließen.

Die Methode ist für die Typhus-Coli-Gruppe in dieser Form sehr sicher, ebenso für die großen Spirillen, auch für *Proteus* und die *Heubacillengruppe*. Für Cholera und andere Vibrionen ziehe ich die *Zettnowsche Methode* vor. Allgemein wird heute der *Pepperschen Methode* der Vorzug gegeben, auch dem Anfänger glücken mit ihr die Präparate.

Verstärkung der Tanninbeizung durch Jod.

Trenkmann läßt die trockenen, nicht durch Hitze fixierten Präparate 6—12 Stunden oder länger in einer 2%igen Tanninlösung liegen, die $\frac{1}{2}$ oder $\frac{1}{4}$ % HCl enthält. Reichlich Wasserspülen, dann eine Stunde in Jodwasser einlegen (wird hergestellt durch Einlegen von reinem Jod in Wasser, öfters umschütteln, stehen lassen einen Tag und länger). Dann Wasserspülen und färben in schwacher Anilinwassergentianaviolettlösung (1 Tropfen konzentriertes alkoholisches Gentianaviolett und 10 cm^3 Aqua dest. + 20 cm^3 Anilinwasser) eine halbe Stunde.

Schon *Bunge* vereinfachte die *Löfflersche Methode* dahin, daß er auf die Alkali- bzw. Säurebeigaben zur Beize verzichtete.

Die *Bungesche Beize* ist eine Mischung von 30 cm^3 gesättigter wässriger Tanninlösung mit 10 cm^3 einer wässrigen Verdünnung (1 : 20) von Liquor ferri sesquichlor.; zu 10 cm^3 dieser Mischung gibt er 1 cm^3 einer gesättigten wässrigen Fuchsinlösung. Die Mischung muß einige Tage stehen. Direkt vor dem Gebrauch fügt man zu einem kleinen Quantum der Beize soviel Wasserstoffsuperoxyd hinzu, bis sie rotbraun wird (etwa 13—15 Tropfen 3%iger Wasserstoffsuperoxydlösung auf 5 cm^3 Beize).

Bunges Methode.

1. Beize filtrieren, unter Erwärmen 1—5 Minuten einwirken lassen; 2. abspülen in Wasser; 3. färben mit Carbolgentianaviolett, unter leichtem Erwärmen; 4. abspülen in Wasser trocknen, Einschluß.

Methode von Körner-A. Fischer.

Beize: 2 g Tannin, Aqua dest. 20·0, Ferrosulfatlösung (1 : 2) 4·0, gesättigte alkoholische Fuchsinlösung 1·0.

Methode: 1. Beizen 1 Minute lang unter Erwärmen; 2. abspülen mit Wasser; 3. färben mit Anilinwasser- oder Carbolfuchsin oder gesättigter wässriger Fuchsinlösung; 4. abspülen in Wasser, trocknen, einlegen.

A. Meyer empfiehlt, nach Anwendung der Löfflerschen Beize (Fuchsin) 3—5 Minuten ohne Erwärmung und Wasserspülen als Farbe folgende Lösung zu benutzen: 1 g Säureviolett 6B von Bayer & Cie. (unter diesem Namen von Siebert und Ziegenbein in Marburg a. L. oder unter dem Namen Säureviolett 1897, Ersatz für Hoffmannsblau von Grübler & Cie. zu beziehen), 75 cm³ 95%iger Alkohol, 75 cm³ dest. Wasser. Erwärmen über Mikrobrenner bis schwache Dampfbildung eintritt unter Neigen des Deckglases, um die Flüssigkeit in Bewegung zu erhalten, 2—3 Minuten, Wasserspülen, trocknen.

*Methode von A. Peppler.**1. Peppler-Beize.*

20 g Tannin unter gelinder Erwärmung in 80·0 cm³ destillierten Wasser lösen, abkühlen auf ca. 20°, hierzu 15·0 wässrige schwefelsäurefreie Chromsäurelösung (2·5%ig) langsam in kleinen Portionen unter fortwährendem Umschütteln hinzufügen. 4—6 Tage ruhig im Zimmer stehen lassen (möglichst nicht unter 18°) oder im Brutschrank von 20°. Filtrieren durch doppeltes Faltenfilter, ohne stärker abzukühlen. Die klare dunkelbraune Flüssigkeit zeigt mit der Zeit einen geringen hellbraunen Niederschlag, ohne dadurch minderwertiger zu werden. Aufbewahren im Zimmer. Filtrieren vor Anwendung. Bei niedrigerer Temperatur setzt die Beize stärker ab und verliert ihre Wirkung. Einstellen der unfiltrierten Beize bei 20° restituiert sie, längeres Aufheben bei 20° im Brutschrank ist zu vermeiden.

2. Farbstofflösung.

Konzentrierte alkoholische Gentianaviolettlösung (5·0 : 100·0) 10·0, Acid. carbol. liquef. 2·5; Aqua dest. ad 100·0. Nach einigen Tagen Stehens filtrieren.

Verfahren.

1. Beizen 1—5 Minuten in der klaren, eventuell vorher filtrierten Beize; 2. abgießen der Beize, sehr sorgfältig mit kräftigem Strahl Leitungswasser spülen. Spülwasser gut ablaufen lassen, nicht abtrocknen; 3. färben 2 Minuten lang; 4. sorgfältig Wasserspülen; 5. trocknen, einschließen.

Verfahren von *G. L. Valenti*.

Beize: Gerbsäure (chemisch rein) 20 g, destilliertes Wasser (gekocht) 100·0. Erwärmen, dann filtrieren. Im Dunkeln jahrelang haltbar.

Farbe: Fuchsin-Rubin 1 g, krystallisierte Carbolsäure 5 g, Alcohol abs. 10 cm³, Aqua dest. 100 cm³. Nach 24 Stunden filtrieren. Wenn die Lösung frisch ist, so kommt sie zur Anwendung in der Verdünnung 1:2 Teilen Aqua dest.

Verfahren: 1. Deckglas beschicken mit Bakterienaufschwemmung in lauwarmem destilliertem Wasser, die etwa $\frac{1}{2}$ Stunde im Zimmer ruhig gestanden hat. Trocknen bei gewöhnlicher Zimmerluft oder im Exsiccator. Keine Flammenfixation; 2. auftropfen von Beize, so daß Deckglas völlig bedeckt ist, abgießen. Das noch feuchte Deckglas nunmehr 3. färben unter leichtem Erwärmen (10 cm hoch über kleiner Flamme) ca. 10 Sekunden, bis ganz geringe Dämpfe aufsteigen; 4. einige Sekunden abkühlen lassen; 5. Wiederholen der Erwärmung 2—3mal; 6. abspülen mit destilliertem Wasser; 7. trocknen zwischen Fließpapier. Balsam.

Verfahren von *E. Gemelli*.

1. Deckglasausstriche trocknen unter Glasglocke mit Chlorealcium; 2. 10—20 Minuten einlegen in Kaliumpermanganatlösung 0·25%ig; 3. gut auswaschen in destilliertem Wasser; 4. 15—30 Minuten färben in Neutralrot (1%ige Neutralrotlösung 1 Teil auf 20 Teile einer 0·75%igen Chlorealciumlösung); 5. waschen, trocknen mit Fließpapier. Balsam. Verwendet man peinlichst gereinigte Deckgläser, so zeichnet sich das Verfahren in der Tat durch Fehlen von Niederschlägen aus. Leider sind die Erfolge aber recht schwankend.

Geißelfärbung nach *de Rossi*.

1. Präparat nicht fixieren; 2. aufgeben von 1 Tropfen Beize und 4—5 Tropfen Farbe, es entsteht ein Niederschlag. Einwirken lassen 15—25 Minuten bei Zimmertemperatur oder 25—30 Sekunden über kleiner Flamme schwach erwärmen (ohne Dampfbildung); 3. Wasser-spülen trocknen, einschließen.

A. 50 g reine krystallisierte Carbolsäure in 1 l destilliertem Wasser und 40 g reines Tannin auf Wasserbad erwärmen bis zur Lösung.

B. Basisches Fuchsin (Rosanilinchlorhydrat) 2·5, absoluter Alkohol 100·0.

C. Kaliumhydrat 1·0, destilliertes Wasser 100·0 in Tropfglas.

A und B werden gemischt.

Vor der Färbung versetzt man 15—20 cm³ der Mischung AB mit 2—3 Tropfen der Lösung C. Der Niederschlag löst sich beim Schütteln. Weiter Alkali zusetzen unter Schütteln, bis feiner staubartiger Niederschlag entsteht. Wiederholt filtrieren, bis das Filtrat mehrere Minuten lang ganz klar bleibt. Erneut filtrieren und vom Filtrat 3—5 Tropfen auf die Präparate, auf denen nach einiger Zeit ein Schillern und danach

Trübung mit Niederschlag beobachtet wird. Dann abspülen mit destilliertem Wasser, trocknen.

Das Verfahren gibt ziemlich viel Niederschläge.

Methode von *Pitfield*, modifiziert von *Benignetto* und *Gino*.

1. Fixation durch Hitze; 2. färben unter Erwärmen in Gentiana-violett alkoholisch gesättigt 3·0 Alaun mäßig gesättigt 5·0, Zinc. sulfur. 1%ig 5·0, Tannin 10%ig 5·0; 3. Wasserspülen, trocknen, Einschluß.

Auch dies Verfahren ergibt viel Niederschläge.

Geißelfärbung nach *Casares-Gil*.

Stammlösung: 10 g Tannin und 18 g Aluminiumchlorhydrat werden in Reibschale mit 30 cm³ 70%igem Alkohol gelöst. Dann fügt man tropfenweise eine Lösung von 10 g Zinkchlorür in 10 cm³ Wasser und 1·5 g Rosanilinechlorhydrat hinzu. Die Stammlösung wird unfiltriert im Dunkeln aufbewahrt.

Ausführung: 1. In einem Reagensglas mischt man schnell 1 Teil Stammlösung mit 4 Teilen destillierten Wassers, läßt 1 Minute absetzen und filtriert direkt auf das Präparat; Einwirkungsdauer ungefähr 1 Minute (bis sich ein Häutchen von metallischem Glanz bildet). Nun schnell 2. reichlich Wasser spülen bei weit geöffnetem Hahn; 3. nachfärben mit Carbofuchsin oder Methylenblau 1—2 Minuten.

Methode von *Tribondeau*.

1. Nach Trocknen sofort in Alkohol fixieren, dessen letzte Tropfen in der Flamme abgebrannt werden; 2. darnach gibt man in eine kleine Porzellan- oder Emailschele 5 cm³ der Beize (10%ige Tanninlösung in destilliertem Wasser 1 Teil, gesättigte wässrige Alaunlösung 2 Teile). Über der Flamme zum Kochen bringen, dann mit Pipette 0·5 alkoholischer Krystallviolettlösung (s. unten), mischen. Kochen, mischen. Heiß auf das Präparat aufgießen, 15—30 Sekunden einwirken lassen.

Sorgfältig waschen unter dem Wasserhahn. Abtropfen lassen, über der Flamme trocknen. Einschließen.

Einstellung der Krystallviolettlösung.

Stammlösung: Krystallviolett 2·0, absoluter Alkohol 10·0. Man stellt die Verdünnungen her:

Stammlösung	0·2,	0·1,	0·1,	0·1 cm ³ ;
absoluter Alkohol . .	1·0,	1·0,	1·5,	2 cm ³ .

0·5 dieser Verdünnungen werden mit je 5 cm³ Beize gemischt, man macht mit dieser Mischung die oben angegebenen Manipulationen, nimmt aber nicht mit Bakterien beladene Objektträger, sondern leere; man stellt nun fest, nach welcher Zeit die auf dem Objektträger befindliche und gegen einen weißen Untergrund gehaltene Beizfarbmischung einen Niederschlag gibt. Die optimale Farbstoffverdünnung ist diejenige, bei welcher mit bloßem Auge nach 5 spätestens 10 Sekunden der Niederschlag in die Erscheinung tritt. Entsteht der Niederschlag vorher, so tritt Überfärbung ein, entsteht er

später, so ist die Farbe zu schwach. Bei Krystallviolett-pulver ist in der Regel die optimale Verdünnung folgende: Stammlösung 2 auf 10 1 Teil, Alcohol abs. 10 Teile.

B. Darstellung durch Metallsalze.

Geißelfärbungen nach *van Ermengem*.

1. Präparat zwischen Finger fassen, dreimal durch Flamme ziehen; 2. $\frac{1}{2}$ Stunde in der Kälte beizen. Beize: Acid. osmic. (2% ige Lösung) 1 Teil, Tannin (10—25% ige Lösung) 2 Teile. Man kann abkürzen, indem man 5 Minuten bei 55—60° beizt. Die Tanninlösung kann auf 100 cm^3 4—5 Tropfen Eisessig enthalten; 3. sorgfältig abspülen mit Wasser und Alkohol, dann 4. einige Sekunden in eine 0·5—0·25% ige Silbernitratlösung tauchen; 5. ohne Abspülen in Lösung von Acid. gallic. 5·0, Tannin 3·0, Kal. acet. fus. 10·0, in Aqua dest. 350·0. Nach einigen Augenblicken zurück in 6. 0·5—0·25% ige Silberlösung, bis Schwärzung beginnt; 7. viel Wasser, trocknen zwischen Fließpapier, Balsam.

Bakterien dunkelbraun, Geißeln schwarz. Statt der Silberlösung kann man auch ein Gold-, Quecksilber- oder Uranbad anwenden.

Nach *W. Kuntze* soll die Beize beim Gebrauch mindestens eine Woche alt sein. Man beizt im Schälchen. Nach der Beizung faßt man mit *Cornets* Pinzette. Will man tadellose Präparate haben, so ist bei der Färbung mit Gold- oder Silbersalzen die Berührung des Deckglases mit Metall zu vermeiden. Hierzu dient die von *W. Kuntze* angegebene Pinzette mit Glasspitzen (bei O. Preßler, Leipzig, Brüderstraße). Eine andere Glaspinzette empfiehlt *A. Hinterberger* (zu haben bei Woytaczek, Wien IX, Frankgasse 10). Die anschließende Färbung übt *W. Kuntze* wie folgt aus:

1. Abspülen des Deckglases mit destilliertem Wasser; 2. auf das noch feuchte Präparat aus Tropfflasche 1% ige alkoholische (90 bis 96% igen Alkohol) Silbernitratlösung tropfen, mehrere Sekunden wirken lassen; 3. mit einem Schuß Entwickler aufgeben, so daß das Deckglas völlig bedeckt ist (Ac. gall. 5·0, Tannin 3·0, Natr. acet. fus. 10·0, Aqua dest. 350·0). Nach ganz kurzer Einwirkung ablaufen lassen und erneut 4. alkoholische Silberlösung aufgeben. Die sofort entstehenden Wolken eines schwarzen Niederschlages schwemmt man nach 2—3 Sekunden durch weiteren Zusatz von Silbernitrat weg; 5. abspülen mit destilliertem Wasser; 6. absoluter Alkohol. Trocknen hoch über Flamme. Falls Niederschläge: 7. Nachbehandeln und klären mit Goldchlorid 1 : 2000—1 : 3000 ganz kurz, nachdem man vorher das Präparat einige Zeit dem hellen Tageslicht ausgesetzt hat. Goldchlorid ist sorgfältig zu entfernen. Es empfiehlt sich dann noch, die Präparate einige Tage am Licht liegen zu lassen. (Die Reduktion des Goldes erfolgt ziemlich langsam.)

Wir haben es also bei diesen Verfahren mit einem photochemischen Prozeß zu tun, deshalb sind auch die Erfolge am besten bei hellem Tageslicht.

Ein ausgezeichnetes Verfahren zur Beseitigung der Niederschläge bei der Methode *van Ermengems* ist die von *Hinterberger* empfohlene Behandlung mit einer 7%igen Kochsalzlösung und abspülen mit verdünntem Ammoniak (Liqu. ammon. 1:4—5). Letzteres darf man aber nur sehr vorsichtig einwirken lassen, da sonst unter seinem Einfluß die Haltbarkeit der Präparate leidet.

Von Modifikationen der Methode *van Ermengems* ist zu erwähnen:

1. Die von *Stephens* vorgeschlagene Verwendung einer 2%igen Larginlösung an Stelle des 0.2%igen Silbernitrates.

2. Abänderung der Methode *van Ermengems* durch *A. Hinterberger*.

1. Die lufttrockenen Deckgläser fixieren durch Einlegen auf 2 Minuten in ein Schränkehen von 105° oder durch Alkohol abs. und Verjagen des Alkohols auf dem heißen Blech (nach *Sobernheim*); 3. betropfen mit Beize. Einwirkenlassen 30 Minuten (in feuchter Kammer). Beize: 2%ige Osmiumsäurelösung 1 Teil, 20%ige Tanninlösung mit 4 Tropfen Ac. acet. glac. auf 100 cm³ 2 Teile. Die Beize muß blank schwarz, schwarzblau oder schwarzviolett sein und gut fließen, im andern Falle ist sie zu erwärmen und öfter zu filtrieren; 3. abspülen unter Wasserhahn; 4. einlegen in absoluten Alkohol auf einige Minuten; 5. einlegen in Petrischale, die mit 1 Tropfen Eisessig angesäuertes Wasser enthält. Mindestens für 1/2 Minute; 6. wieder einlegen in Alkohol abs.; 7. auf Fließpapier ablaufen lassen. Fassen mit Glaspinzette; 8. abspülen mit Wasser, dann mit 95%igem Alkohol, dann mehrmals eintauchen in erst warme 5%ige wässerige Silbernitratlösung, dann in warme alkoholische Silberlösung (AgNO₃ 2.5, H₂O 500.0, Alkohol 95%ig 500.0); 8. ausfällen in physiologischer Kochsalzlösung; 9. lösen in 25%iger Ammoniaklösung; 10. spülen in 95%igem Alkohol; 11. spülen in Wasser; 12. eintauchen in den Entwickler (lauwarm bereitete 1.5%ige Gallussäurelösung 40.0, 50%ige Lösung von doppelt geschmolzenem essigsäuren Natron 2.0), abschneiden; 13. eintauchen in 2.5%ige wässerige alkoholische AgNO₃-Lösung bis die Lösung sich trübt, dann sofort zurück 14. in Kochsalzlösung. Wiederholen 9., 10., 11., 12., dann 15. II. Färbung in wässriger Silberlösung 5%ig AgNO₃. Sobald Trübung entsteht, ist Präparat fertig. Einlegen in Wasser.

Man kann die Tonung (Vergoldung) anschließen: 1. Einlegen auf 4 Minuten in Goldlösung (Goldchlorid 1.0, Wasser 100.0) 1 Teil, unterschwefligsaures Natron 175.0, Alaun 2.0, Rhodanammonium 10.0, Chlor-natrium 40.0, Wasser 1000.0 Teile. Es tritt schwarzblaue Färbung ein. 2. Abspülen in Wasser, einlegen in Alkohol, trocknen im Wärmeschrank, Einschluß.

Die Methode ist umständlich, sie ist ebenso wie alle anderen der Methode *van Ermengens* nachgebildeten Verfahren verdrängt worden durch die bei weitem einfachere *Zettnowsche* Methode.

Geißelfärbung nach *Zettnow* (c, d).

1. Herstellung der Antimonbeize. a) 2 g Tartarus stibiatus in 40 cm³ Aqua dest.; b) 10 g Tannin in 200 cm³ Aqua dest. Man erwärmt die Tanninlösung auf 50—60°, setzt alsdann 36—37 cm³ der Brechweinsteinlösung hinzu und erhitzt das Gemisch, bis der Niederschlag sich völlig gelöst hat. Hierauf gießt man etwas von der klaren Beize in ein Reagensglas und stellt es in kaltes Wasser. Nach dem Erkalten in 5—8 Minuten muß die Beize ordentlich trübe werden, jedoch nicht zu stark; ist letzteres der Fall, d. h. erscheint die Flüssigkeit milchweiß, so fügt man zu der Hauptmasse ein wenig festes Tannin: bleibt sie jedoch hell, so setzt man noch 1 cm³ der Brechweinsteinlösung hinzu. Eine gut gelungene Beize soll beim Erkalten in 5 Minuten anfangen sich zu trüben; der Niederschlag nimmt bei längerem Stehen, z. B. nach 1—2 Tagen zu, soll jedoch nicht so stark werden, daß er sich absetzt: derartig trübe Beize soll beim Erhitzen in einem Reagensglase, z. B. durch Einsetzen in Wasser von 75—80° sich leicht und völlig klären. Sie ist monatelang haltbar. Ein Stückchen Thymol schützt vor Pilzwachstum.

2. Silberlösung. 2—3 g Silbersulfat (das man sich aus Silbernitratlösung durch Zusatz von Magnesium- oder Natriumsulfat herstellen kann) werden kräftig mit 200 cm³ Aqua dest. zur Gewinnung einer gesättigten Lösung geschüttelt. Diese Lösung ist unbegrenzt haltbar. Hiervon versetzt man in einem Reagensglas eine beliebige Menge mit destilliertem Wasser aa und fügt tropfenweise von einer 33%igen (käuflichen) Äthylaminlösung soviel hinzu, bis der zuerst entstehende gelbbraune Niederschlag von Silberoxyd sich eben wieder gelöst hat und die Flüssigkeit klar geworden ist. Die Lösung ist lange haltbar (im Dunkeln). Eine etwa auftretende Braunfärbung ist belanglos.

Ausführung der Methode: 1. Ausstriche nach dem Osmiumsäureverfahren lufttrocken zweimal durch die Flamme ziehen; 2. Präparat mit Schichtseite nach unten in ein Blockschälchen legen und mit der durch Erhitzen im Reagensglas geklärten Beize reichlich übergießen, mit Glasplatte bedecken und für 5—7 Minuten auf eine etwa 100° heiße Eisenplatte stellen. Man kann sich auch einer über kochendem Wasser liegenden dünneren Platte bedienen oder die Schälchen für 15—20 Minuten in einen Schrank von 70—80° setzen. Die Temperatur der Beize ist richtig, wenn die Schälchen so heiß sind, daß man sie gerade noch anfassen kann; man nimmt sie dann von der Platte, entfernt den Deckel, läßt erkalten, bis die Flüssigkeit eben anfängt, sich zu trüben; 3. sorgfältigst mit Wasser abspülen; 4. 3—4 Tropfen Äthylaminsilber auf das Deckglas geben und erhitzen, bis die Flüssigkeit stark raucht und die Ränder des Ausstriches schwarz erscheinen; 5. abspülen in Wasser.

Geißeln schwarz auf hellem Untergrunde.

Die gewöhnliche Osmierung kann aber für Herstellung von Geißelpräparaten versagen: es gibt Bakterienarten, deren Geißeln vom Osmium nicht genügend fixiert werden und vor dem Antrocknen quellen oder sich auflösen. *Zettnow* (b) ging darauf aus, hier durch Adstringenzen nachzuhelfen. Tannin und Chromalaun waren erfolglos. Hingegen gelang es ihm durch Aluminiumsulfat bei gleichzeitiger Anwendung von Sublimat als Fixierungsmittel bei seinem *Micrococcus sensibilis* gute Präparate zu erhalten.

Zettnows abgeändertes Verfahren (d, S. 217). 1. Auf ein frisch ausgeglühtes Deckglas bringt man 2 Ösen Leitungswasser, bringt in das erste Tröpfchen eine kleine Quantität Kultur und läßt den Mikroorganismen 10—15 Sekunden Zeit zur Geißelverwendung. Hierauf Zugabe von 2—3 Tropfen Fixierungsflüssigkeit (30 cm^3 Aluminiumsulfat 1 : 500 werden gemischt mit 10 cm^3 wässriger Sublimatlösung 1 : 20); 2. Senkrechtstellen des Deckglases und Abtropfenlassen der Flüssigkeit, an Ablaufstelle mit Fließpapier Flüssigkeit möglichst entfernen; 3. sogleich 4—5 Tropfen 90—95 % igen Alkohol auf die feuchte Fläche bringen, 10—15 Sekunden lang einwirken lassen. Ablaufen lassen und absaugen. Auftropfen und Absaugen des Alkohols noch zweimal wiederholen; 4. lufttrocken werden lassen; 5. Fixation durch Flamme, darnach in üblicher Weise Antimonbeize und Äthylaminsilber.

Um klarere Präparate zu erhalten, tropft man nach dem Abgießen des Äthylaminsilbers 1 % igen Ammoniak auf das Präparat, läßt 3 bis 4 Sekunden lang einwirken, nun erst Wasserspülen. (Etwaige Niederschläge von Silberoxyd lösen sich hierdurch, hingegen bleibt das in den Bakterien abgeschiedene Silber unangegriffen.)

Ist die Beize stark trübe und klärt sie sich auch beim Erhitzen bis zum Kochen nicht völlig, so kann man die blaß erscheinenden Geißeln verstärken durch Mischung einer Pyrogallollösung mit geeigneter Silberlösung.

1. Vorratslösung jahrelang haltbar, wenn gut verkorkt: 1 g Pyrogallol, 3 g Citronensäure, 20 cm^3 90—95 % iger Alkohol; für den Gebrauch stellt man sich folgende 6—8 Wochen haltbare Lösung her: 1 cm^3 Vorratslösung + 50 cm^3 Aqua dest. (brauchbar auch wenn Bräunung erfolgt); 2. Silberlösung unbegrenzt haltbar: 0.25 g salpetersaures Silber + 0.3 g Citronensäure + 50 cm^3 Aqua dest. Zur Verstärkung tropft man auf das Deckglas 4 Tropfen der verdünnten Pyrogallollösung, hierauf 2 Tropfen der Silberlösung, mischt unter Schwenken und läßt 30—60 Sekunden einwirken. Das reduzierte Silber setzt sich nur an vorhandene Silberteile an, damit erfahren die Geißeln intensive Schwärzung. Darnach trocknen, Balsam.

Kapselfärbung.

Im folgenden sollen Methoden aufgezählt werden, welche als Kapselfärbungsmethoden empfohlen worden sind. Dabei muß aber be-

rücksichtigt werden, daß die ganze Kapselfrage bisher nur unvollständig in der Bakteriologie bearbeitet wurde. Man müßte erst einmal definieren, was man eigentlich unter einer Kapsel versteht. Besagt der Ausdruck, daß es sich dabei um ein scharf begrenztes, zum Bakterium gehöriges und mit ihm fest verbundenes Gebilde handelt, so würden wir nur für Organausstriche bestimmter Bakterienarten von Kapseldarstellungen sprechen können. Mustert man besonders gelungene Präparate etwa von *Johnescher* Kapselfärbung bei Milzbrandgewebsausstrichen oder von Pneumokokken- oder Tetragenusorganausstrichen, so kann man sich des Eindrucks nicht erwehren, daß die Kapselsubstanz nach außen durch eine scharfelinige Scheidewand abgegrenzt ist. In anderen Fällen macht die „Kapsel“ wieder den Eindruck einer weichen gallertigen Masse, die treffender den Ausdruck Schleimschicht (*A. Meyer*) oder Schleimhülle verdient. Das gilt nicht sowohl für Organausstriche, als vielmehr besonders für Ausstriche von Reinkulturen. Bei letzteren sind Kapseln im obigen Sinne selten oder nicht beobachtet, sondern nur Schleimhüllen. Diese aber von Kunstprodukten, einfachen Inter-cellularmassen u. s. w. zu unterscheiden, war bisher gar nicht so einfach. Das gilt besonders für Bakterien, die in eiweiß- oder schleimhaltigen Suspensionen zum Antrocknen gebracht werden. Man kann sich dann bei Bakterien, die, wie Tuschepräparate zeigen, Schleimhüllen sicher nicht besitzen, davon überzeugen, daß helle Höfe, die leicht als Kapseln gedeutet werden können, zur Beobachtung kommen, wenn die Präparate gefärbt werden. Diese hellen Höfe (Scheinkapseln) kann man sich entstanden denken entweder dadurch, daß die Suspensionsflüssigkeit sich von den Bakterien beim Trocknen zurückzieht, oder auch, was wohl seltener zutreffen dürfte, daß die Bakterien bei ihrem hohen Wassergehalt stärker schrumpfen zu einer Zeit, wo das umgebende Material schon in einem gewissen Beharrungszustand fest am Glas haftet. Es kann also ein heller Hof ein Kunstprodukt sein, er kann aber auch der ungefärbten Kapsel oder der Schleimschicht entsprechen. Es war ja durchaus naheliegend, zur Kapseldarstellung die Bakterien nicht in Wasser aufzuschwemmen, sondern ein Suspensionsmedium zu wählen, das einmal die Kapseln nicht schädigt und ferner den Farbstoff annimmt, damit die schwer färbbare Kapsel sich ungefärbt vom Untergrund abhebt. Deshalb nahmen *Hiß*, *Epstein*, *Bürger* u. a. zum Suspensieren Lösungen von Blutserum, Ascites u. s. w. Alle diese Arbeiten bedürfen einer Nachprüfung, seitdem in dem Verfahren mit Tusche oder kolloidalem Silber eine Kontrolle dafür gegeben ist, was die verschiedenen Kapseldarstellungsmethoden zur Anschauung bringen. Vgl. hierzu die Ausführungen von *A. Meyer*, b S. 160, ferner die wertvollen Untersuchungen von *Toennissen*.

Bei frischen Organ- oder Blutausstrichen, bei frischen Sputumpräparaten von Pneumonie u. s. w. ist meist eine besondere Methode zur Kapseldarstellung gar nicht nötig, man beobachtet sie schon mit

den einfachsten Methylenblau- oder Fuchsin- oder *Gram*-Färbungen. Reicht man damit nicht aus, so ist das alte *Johnesche* Verfahren besonders empfehlenswert. Fernerhin wird man solche Methoden bevorzugen, bei welchen die Kapsel oder Schleimschicht eine von der Umgebung und dem zugehörigen Bakterium verschiedene Farbtönung annimmt.

I. Methoden mit Essigsäure.

Vorangestellt sei die zuverlässige Methode von *Johne*.

Kapselfärbung nach *Johne*.

1. Frisches Präparat (Blut- oder Milzausstrich u. s. w.) lufttrocken dreimal vorsichtig durch die Flamme ziehen; 2. färben mit 2%iger wässriger Gentianaviolettlösung unter leichtem Erwärmen $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Minute; 3. ganz kurz eintauchen in Wasser; 4. entfärben in 1—2%iger Essigsäure 6—10 Sekunden; 5. abspülen und untersuchen in Wasser.

Besonders geeignet und sicher bei Milzbrandausstrichen, die Kapseln treten scharf hervor, sie erscheinen mattgefärbt, die Bacillen stark violett. Bei Reinkulturen nur ausnahmsweise Andeutungen, wohl aber bei Kultivierung in flüssigem Serum.

Methode von *Friedländer*.

1. Vorbehandlung der fixierten Präparate 1—3 Minuten mit 1%iger Essigsäure; 2. abspülen, trocknen; 3. färben mit Anilinwassergentianaviolett einige Sekunden; 4. Wasserspülen, trocknen, Einschluß oder abspülen mit 1%iger Essigsäure oder 50%igem Alkohol.

Methode von *Ribbert*.

1. Färben in folgender Farblösung: Wasser 100·0, Alcohol abs. 50·0, Eisessig 12·5, dazu soviel Dahlia, als sich in der Wärme löst; 2. Wasserspülen, untersuchen in Wasser. (Trocknen und Einschluß weniger empfehlenswert.)

Methode von *Bunge* s. S. 350.

Die Methode von *Noetzel* schickt der Gentianaviolettffärbung eine Vorbehandlung des fixierten Präparates mit 5%iger Essigsäure einige Minuten voraus, dann Wasserspülen, Färbung. Auch 1%ige Kalilauge 3—5 Minuten lang bringt die Kapseln zum Quellen. *Noetzel* wendet sie ebenso wie die Essigsäure an.

Mir erscheint diese Methode recht eingreifend.

Methode von *Serafini*, abgeändert von *Preiß* (Milzbrand).

1. Fixieren in Flamme oder Methylalkohol; 2. färben mit Anilinwassergentianaviolett $\frac{1}{2}$ —3 Minuten; 3. entfärben in $\frac{1}{2}$ —1%iger Essigsäure einige Sekunden; 4. sofort waschen mit Wasser. Untersuchen in Wasser.

Bacillen dunkelblau, Kapsel rötlich.

Methode von *Welch*.

1. Nach Fixation in der Flamme mit Eisessigsäure übergießen für einige Sekunden; 2. abgießen, bedecken mit Anilinwassergentianaviolett. Diese Farbe 3—4mal erneuern bis zur Entfernung aller Säure. Dann

noch 3 Minuten einwirken lassen; 3. abwaschen in 2%iger Kochsalzlösung und hierin besichtigen.

Man kann nach der Salzwasserauswaschung schnell mit einer 5 bis 10%igen wässerigen Lösung von Kalium ferrocyanatum abspülen, dann trocknen mit Fließpapier und konservieren mit Balsam.

II. Färbung mit Erhitzen oder besonderer Differenzierung.

Kapselfärbung nach R. Klett (a).

1. Präparat gut lufttrocken werden lassen, Fixation in Flamme; 2. ganz kurz eintauchen in wässriges Fuchsin oder Violett; 3. abspülen in Wasser; 4. aufbringen von Aqua dest. und 6—12mal durch die Flamme ziehen; 5. abspülen und untersuchen in Wasser. Eventuell nochmals kräftig erwärmen.

Empfohlen für Milzbrand. Die so dargestellten Kapseln vertragen auch Einschluß in Balsam. Die Methode ist wegen der starken Erhitzung zu eingreifend.

Dasselbe gilt von dem Vorgehen *Lüpkens*, der mit 0.2%iger Genvianaviolettlösung bis zum Blasenpringen erhitzt, dann Wasserspülen.

Methode von Olt.

Farblösung: Safranin 3 g in 100 cm³ siedend heißem destillierten Wasser gelöst, filtriert nach Erkalten.

Färbung 1—2 Minuten unter Erhitzen.

Besonders empfohlen für Milzbrandausstriche: Bacillen rot, Kapseln gelb.

Boniss Methode.

Suspensionsflüssigkeit: 1 Hühnereiweiß + 50 cm³ Glycerin + 2 Teile Formalin, schütteln, filtrieren.

1. 1 Öse dieses Glycerineiweißes versetzen mit kleiner Menge Kultur und zu sehr dünner Schicht ausstreichen. Über die Flamme ziehen, bis Bildung weißer Dämpfe aufhört (vollständige Verdampfung des Glycerins); 2. färben mit *Ziehlschem* Carbofuchsin 20—30 Sekunden; 3. abspülen mit Wasser, trocknen zwischen Fließpapier; 4. nachfärben mit *Löfflers* Methylenblau (4—6 Minuten); 5. abspülen mit Wasser, trocknen, Balsam.

Bakterien blau, Untergrund rot, Kapseln farblos.

Boni will mit dieser Methode bei einer ganzen Reihe von Reinkulturen Kapseln nachgewiesen haben (*Sarcina flava*, *alba*; *B. subtilis*, *mycoides*, *megatherium*, *ac. lactici*, *anthracis*, *B. coli commune*, *rhinoscleromatis*, *mallei*, *pneumoniae*, *typhi*, *diphtheriae*, *pestis*, *V. aquatilis*, *Diplococcus pneumoniae*, *Streptoc. pyog.*, *Staphyloc. pyog. aureus*.)

Man muß den schon von anderen Seiten (unter andern *Hamm*) geäußerten Bedenken gegen diese Methode beipflichten: das zum Verdampfen des Glycerins notwendige starke Erhitzen dürfte das Entstehen von Kunktprodukten begünstigen, nach allen Erfahrungen sind ja doch die Kapseln recht empfindliche Gebilde.

Czaplewski benutzt die *Bonische* Methode der Präparierung des Materials, färbt kurz mit Carbolgentiana, spült ab und chromiert (1% ige Chromsäure, $\frac{1}{2}$ —1 Minute), Wasserspülen, trocknen. Untersuchen in Öl, Balsam. Die Chromierung macht die Präparate haltbarer (Bacillen der *Aerogenes*gruppe, Kultur und Stuhl).

Methode von *Nicolle*. Differenzierung mit Acetonalkohol.

1. Färben in alkoholisch (95% ig) gesättigter Lösung von Gentianaviolett 10·0 + 1% iges Carbolwasser 100·0; 2. abspülen in Mischung von absolutem Alkohol + $\frac{1}{3}$ Volumen Aceton; 3. abspülen in Wasser, trocknen, Einschluß.

Methode von *Hiß*.

1. Nach Fixation in der Flamme mit alkoholisch gesättigter Lösung von Gentianaviolett oder Fuchsin bedecken, über die Flamme kurz halten bis Dampf aufsteigt; 2. abwaschen mit 20% iger Kupfersulfatlösung; 3. trocknen (nicht waschen). Balsam.

III. Metachromatische Darstellung und Doppelfärbungen.

Heim (a, b) benutzte zur Kapseldarstellung alle Farben, die Mucinreaktion geben (rotstichiges Methylenblau, Methylenazur, Thionin, *Lauthsches* Violett, Formalingentiana, Safranin, Mucicarmin). Schüttelt man *Löfflers* Methylenblau mit Chloroform (oder Äther) aus und erscheint das sich wieder ausscheidende Chloroform (bzw. der Äther) rot, so ist die Farblösung auch zur Kapseldarstellung geeignet, es darf aber nur kurz mit Wasser gespült werden, alsdann trocknen zwischen Fließpapier (Wasser zieht die Rosafarbe der Kapsel aus). Besonders geeignet für Milzbrand-, Organ- bzw. Blutausstriche. Bacillen dunkelblau, Kapseln rosa. Bei Reinkulturen nur, wenn Züchtung auf Blutserum geschah oder ganz junge Agarkulturen mit erster Generation aus dem Tierkörper verwendet wurden.

Ebenso geeignet ist natürlich alte Mansonlösung (Kapsel rosa bis rotviolett) oder Methylenblaucosingemisch oder Methylgrünpyronin.

Auch die *Giemsa*-Färbung ergibt gute Kapseldarstellung (Kapsel hellrötlich). Bei Milzbrand: *Ernst, Foth*. Vgl. auch *Hamm* (S. 348), ferner *R. Hoffmann* (S. 350), die *Jenner-May* benutzt.

Foths Methode der Kapselfärbung für Milzbrandausstriche.

1. Deckglasausstriche, gleichmäßig dünn, lufttrocken werden lassen. Nicht fixieren;

2. bedecken mit methylalkoholischer *Giemsa*-Lösung, genau $\frac{1}{2}$ Minute;

3. Farbe ablaufen lassen, auftropfen der 10fachen Menge säurefreien destillierten Wassers, mischen durch leichtes Hin- und Herbewegen des Präparates;

4. 1—7 Minuten färben;
 5. abspülen mit kräftigem Wasserstrahl.
- Untersuchen in Zedernöl.

Bei Objektträgerausstrichen: Bedecken des Ausstriches mit zwei gut verteilten Tropfen der Stammlösung, nach 30 Sekunden 20 Tropfen Wasser zulaufen lassen.

Bacillen tiefblau, Kapseln leuchtend rot.

Doppelfärbungen zur Kapseldarstellung.

1. Verfahren von *Pianese* (zitiert nach *Baumgartens Jahresbericht*, Bd. 8, 1892).

1. Ausstriche in *Ziehlscher* Lösung 2 Stunden bei 60—70° halten;
2. gründliches Spülen mit Wasser;
3. entfärben in Alkohol-Fluorescein 2—5 Minuten;
4. ganz kurz eintauchen in Alkohol abs.;
5. abwaschen in Wasser;
6. einige Sekunden eintauchen in Kalicarbonat 1:10.000;
7. Gegenfärbung mit *Löfflers* Methylenblau 5 Minuten lang;
8. abspülen, trocknen, Balsam.

Bacillen blau, Kapseln rot.

2. Verfahren von *Klett* (b).

1. Das gut lufttrockene Präparat mit alkoholisch-wässriger Methylenblaulösung (gesättigte alkoholische Lösung 10·0, Aqua dest. 100·0) unter Erwärmen bis Kochen färben;
2. abspülen mit Wasser;
3. 5 Sekunden (ohne Erwärmen) färben mit alkoholisch-wässriger Fuchsinlösung (Herstellung wie Methylenblaulösung oben);
4. abspülen.

Bakterien blau. Bei genügender Fuchseinschmelzung nimmt die Kapsel Rosafärbung an. Empfohlen für Milzbrand.

Methode von *Frank*.

1. Vorfärben mit 0·5%iger wässriger Eosinlösung 20 Sekunden;
2. nachfärben mit 0·5%iger Methylenblaulösung 10 Sekunden.

Geeignet für Milzbrandkapseln.

Methode von *Kaufmann*.

1. Vorfärben mit *Löfflers* Methylenblau (mehrere Stunden);
2. spülen in alkalischem Wasser (1—2 Tropfen konzentrierte KOH oder NaOH auf ein Uhrschälchen voll Wasser);
3. trocknen;
4. 0·5%ige Argent. nitric.-Lösung oder 0·25%iges Protargol 2—4 Minuten;
5. spülen mit alkalischem Wasser;
6. nachfärben mit alkoholisch-wässrigem Fuchsin (1:20) 5—10 Sekunden;
7. spülen mit alkalischem Wasser;
8. trocknen u. s. w.

Empfohlen für Milzbrand. Bacillen tiefblau bis schwarz, Kapsel dunkelrot.

Für Kapseldoppelfärbungen eignet sich auch die *Gramsche* Methode oder ihre Abänderungen: bei den grampositiven Kapselbakterien verhält sich die Kapsel gramnegativ und nimmt die Gegenfarbe an, also rötliche Färbung bei Anwendung von verdünntem Carbol-

fuchsin, Eosin, Safranin od. dgl. Auch die von *Eisenberg* vorgeschlagene Abänderung der *Claudius*schen Methode (s. S. 290) ist hier zu nennen.

Rosenow schickt der Gram-Färbung eine Beizung voraus.

Rosenows Methode.

1. Bei Beginn der Trocknung bedecken mit 5—10%iger Tanninlösung 10—20 Sekunden; 2. Wasserspülen, trocknen; 3. färben in Anilinwassergentianaviolett $\frac{1}{2}$ —1 Minute unter leichtem Erwärmen; 4. Wasserspülen; 5. Lugol $\frac{1}{2}$ —1 Minute; 6. Entfärbung in 95%igem Alkohol; 7. gegenfärben mit *Grübler*-Eosin (Lösung in 60%igem Alkohol); 8. Wasserspülen, trocknen, aufhellen in Xylol, Balsam.

IV. Kombinationen von Färbung mit Tusche oder kolloidalem Silber.

Verfahren von *Gins* (a).

1. Tusche von *Grübler* (längere Zeit sedimentiert oder scharf zentrifugiert) eine mittelgroße Öse auf Objektträger mit der gleichen Menge Wasser verdünnt. Hierin nadelkopfgroße Menge Kultur (Gruppe des *Rhinosklerombacillus*, *Micr. tetragenus*, Agar- oder Bouillonkultur) verreiben. Ausstreichen mit Schmalseite eines Objektträgers; 2. fixieren des Ausstriches in konzentrierter Sublimatlösung 1 Minute lang; 3. abspülen in Wasser; 4. Färbung in Carbolthionin 5—10 Minuten lang; 5. abspülen, trocknen.

Kapsel ungefärbt, scharf abgegrenzt gegen die Tusche. Bakterien gefärbt.

Nach *Rulison*.

1. Fixation in Flamme; 2. 5 Minuten färben mit Anilinwassergentianaviolett oder nach *Gram*; 3. abspülen mit destilliertem Wasser, trocknen; 4. aufbringen von einem Tropfen chinesischer Tusche, verteilen in dünner Schicht; 5. trocknen. Untersuchen mit Ölimmersion.

Nach *van Riemdijk*.

1. In ein kleines Reagensglas sind 5 Tropfen einer Protargollösung 1:200 mittels Pipette zu geben; 2. hierin verreibt man ein wenig von der frischen Kultur; 3. nun sind 5 Tropfen alkalische Eosinlösung hinzuzufügen (wässrige Lösung von Eosin gelb *Grübler* 1:50, zu 1 cm^3 dieser Lösung wird 1 Tropfen 20%iges Natriumcarbonat, Na_2CO_3 , hinzugefügt; 4. gut mischen und 10—20 Minuten stehen lassen; 5. mit Öse von der Flüssigkeit auf Objektträger gleichmäßig dünn ausstreichen; 6. an der Luft trocknen lassen (ohne Erwärmen); 7. sofort in Zedernöl besichtigen.

Bakterienzelle schwach rötlich, umgeben von weißer Zone mit scharfer roter Randkontur. Untergrund homogen rötlich.

Die Protargollösung ist immer frisch herzustellen (das Protargolpulver ist auf das destillierte Wasser zu schütten, darnach schütteln, bis Protargol gelöst, filtrieren).

V. Kapselfärbungen nach besonderer Fixation.

a) Fixation durch Osmium.

Einen Fortschritt bedeutet die

Kapselfärbung nach *Hamm*,

weil sie hinsichtlich der Fixation Anforderungen gerecht wird, die wir für die Darstellung so vergänglicher und empfindlicher Gebilde stellen müssen.

1. *Hamm* benutzt zum Ausstreichen von kapseltragenden Bakterien unverdünntes Blutserum oder Ascites (in Röhrchen mit Gummistöpsel über Chloroform vorrätig zu halten). Er gibt eine Öse davon auf den Objektträger, fügt eine Spur Kulturmateriel hinzu und verteilt schonend (in Form einer Spiraltour); 2. Fixation nach *Weidenreich-Hamm* (s. S. 280); 3. färben 10—15 Minuten lang mit *Giemsa*-Lösung (1 Tropfen Stammlösung + 1 cm^3 Aqua dest.) unter ganz leichtem Erwärmen über kleiner Flamme während der letzten 3—5 Minuten.

Bakterien (z. B. *Bac. pneum. Friedländer*) himmelblau bis blauviolett, Kapsel rosa bis hellrot.

Ein Vorteil der *Weidenreichs*chen Fixationsmethode ist, daß die Präparate nicht in Wasser untersucht zu werden brauchen, sondern in Kanadabalsam eingeschlossen werden können.

Carpano streicht (*Streptococcus equi*, Pleura- oder Peritonealexsudat; *B. suis* septicum und euissepticum, ebenfalls Exsudate, Rotz, Organaustrich) das Material in dünner Schicht aus, indem er den Objektträger über ein Gefäß mit erwärmtem Wasser hält, so daß das Material nicht trocknet (man kann auch während des Ausstreichens den Objektträger anhauchen), dann sofort Osmiumdampf fixation (s. S. 279 l. e.) 3—4 Minuten. Nun lufttrocken werden lassen. Färbung 1, mit konzentriertem Carbolfuchsin oder Carbolkrystallviolett unter Erwärmen bis erste Dämpfe aufsteigen (im ganzen wenige Minuten), kurz waschen, trocknen, Zedernöl oder Balsam. Oder 2. *Giemsa*-Färbung (1 Tropfen zu 2 cm^3 Aqua dest.) 4—5 Minuten. Waschen, trocknen, Öl oder Balsam.

b) Fixation mit *Müllerscher Flüssigkeit*.

Methode von *L. Bürger*.

1. Ausstreichen von Kulturbakterien in einer Mischung von Serum (Menschen-, Rinder- oder anderes Serum) mit Kochsalz zu gleichen Teilen. Wenn halbtrocken 2. aufgießen von *Müllerscher Flüssigkeit* (Kalium bichromatum 2·5, Natr. sulfur. 1·0, Wasser 100) mit Sublimat gesättigt (durchschnittlich ca. 5—7 % ig), langsam (ca. 3 Sekunden) erwärmen über der Flamme; 3. abspülen in fließendem Wasser, einmal durchziehen durch 80—95 % igen Alkohol; 4. 1 Minute behandeln mit Jodtinktur (7 % ig); 5. abspülen mit Alkohol, bis Alkohol klar bleibt; 6. trocknen an Luft; 7. färben 3 Sekunden mit frischer Anilinwassergentianaviolett lösung oder wässriger Fuchsinlösung. a) Anilinöl 10.

Wasser 100, durchschütteln, filtrieren, dazu 5 cm^3 alkoholisch gesättigte Gentianaviolettlösung; *b*) gesättigte alkoholische Fuchsinlösung 10, Wasser 100. Ist haltbar); 8. auswaschen und einschließen in 2%iger wässriger Kochsalzlösung.

Die Methode vermeidet das Ausstreichen mit Wasser, um eine Schädigung der Kapseln zu verhüten, ferner die Hitze-fixierung. Als Fixationsmittel ist auch Sublimat, gesättigt in 0.5%iger Kochsalzlösung brauchbar.

Kombination mit dem Gramschen Verfahren: nach 5 Anwendung der üblichen Gramschen Methode, Gegenfärbung 1 Minute mit starker wässriger Fuchsinlösung (10—15%ig). Einlegen in Wasser.

Als Einschlußmittel empfiehlt sich bei Gentianaviolett-färbung Kochsalz, bei Fuchsin- und Gram-Färbung Wasser. Balsam ist ungeeignet. Einigermassen brauchbar sind Balsampräparate, wenn man das Salzwasser mit einer 5—10%igen wässrigen Lösung von Kalium ferrocyanatum abspült, trocknen mit Fließpapier, Balsam.

c) Fixation mit Sublimat.

Medalias Methode.

1. Nach Trocknen eintauchen in gesättigte Lösung von Sublimat für 10—20 Sekunden; 2. in fließendem Wasser waschen; 3. färben mit 1%iger Methylenblaulösung, die 1% Soda enthält; 4. abwaschen in Wasser, trocknen, Balsam (s. auch *Gins*, S. 285).

Sublimatfixation empfiehlt zur Darstellung der „Kulturkapseln“ *E. Toenniessen* für die mit Serum oder Serumverdünnungen hergestellten lufttrockenen Präparate.

d) Fixation durch Formalin.

Preusse fixiert in Formalin, färbt mit 2%igem Gentianaviolett und erhielt damit bei Milzbrandorganausstrichen stets Kapseln.

Wadsworths Methode.

1. Fixieren nach Trocknen in Formalin 2—5 Minuten; 2. waschen in Wasser 5 Sekunden; 3. färben mit 10%iger wässriger Gentianaviolettlösung; 4. schnell in Wasser waschen, trocknen, Balsam.

e) Fixation gleichzeitig mit Färbung.

Methode von Rübiger.

Fixierung und Färbung erfolgen in einem Akt durch Formalin-gentianaviolett: 100—150 cm^3 Formalin werden mit 15—20 *g* Gentianaviolett versetzt und kräftig verrührt. Bis zum nächsten Tage warten und filtrieren.

Präparat möglichst dünn ausstreichen, gut lufttrocken werden lassen und 20 Sekunden in der Farblösung färben, abspülen und untersuchen in Wasser oder einschließen in Balsam.

Kapsel rötlichviolett, Bacillen dunkelviolett (s. Milzbrand).

Nach *Schmidt* ist die Färbung von Milzbrandkapseln noch sicherer, wenn man sie auf 4—5 Minuten ausdehnt.

Die Verwendung von Formalinfarben ist unangenehm, aber die Methode gibt gute Bilder.

Hier reiht sich die Methode von *Jenner-May* an, die *R. Hoffmann* zur Kapselfärbung bei *Streptococcus mucosus* empfiehlt. Fixation findet gleichzeitig mit Färbung statt.

1. Ausstrich möglichst dünn fertigen, sobald trocken 2. 2 Minuten in der Farblösung (0·25%ige methyalkoholische Lösung von eosinsaurem Methylenblau — erhältlich bei Dr. Schwalm, München oder Dr. Grübler, Leipzig), dann 3. in neutrales destilliertes Wasser 1 Minute; 4. trocknen durch Abtupfen mit Fließpapier.

Bakterien tiefdunkelblau, Kapsel hellblau. Kapselhülle deutlich und scharf konturiert. Schleimmassen rosa. Anwendbar auch bei Reinkultur.

VI. Anwendung von Beizen.

Schon *Löffler* berichtet, daß man Kapselfärbungen erhalten kann, wenn man der eigentlichen Färbung eine Beizung vorausschickt: Behandelte er Kaninchenherzblutausstriche von Pneumoniebakterien mit Gallustinte (wobei sich die Kapseln grau färbten) und sodann mit Methylenblau, so erhielt er die Kapseln intensiver blau gefärbt als alle übrigen Teile des Präparates.

Zettnow (a) machte die Beobachtung, daß die *Löfflersche* Geißelfärbemethode in manchen Fällen eine ausgezeichnete Differenzierung der „Hüllen“ von Bakterien ermöglicht; Froschlaichbacillen behandelte er mit Antimonbeize (oder Ferrotannat), darnach Färbung beliebig. Beobachtung in Glycerin (zitiert bei *A. Meyer*); auch *C. Günther* liefert Beispiele (5. Auflage, S. 111) für Hüllenfärbung mit *Löfflers* Geißelfärbung. Das gleiche beobachtete *Bunge* mit seiner Modifikation der *Löfflerschen* Geißelfärbung, namentlich wenn vor der Beizung $\frac{1}{2}$ —1 Minute eine 5%ige Essigsäure angewendet wird, dann Wasserspülen. Auch die *Hinterbergersche* Modifikation der Geißelfärbemethode von *Ermengems* ergibt „Kapsel“-Darstellung auch in Reinkulturen.

Einer Tanninbeize bediente sich auch *Rosenow* (S. 285).

Sporenfärbung.

Färbt man einen sporenhaltigen Bakterienausstrich auf die gewöhnliche Weise wie andere Bakterienpräparate, so nehmen die Sporen die Farbe nicht an, höchstens färben sich unreife Sporenstadien bzw. Körnchengebilde, von einem bestimmten Entwicklungsmoment ab erscheinen die Sporen oder ihre Vorläufer als helle Lücken, allenfalls lagert sich Farbstoff außen an, ohne in die Hülle einzudringen.

Die Sporenfärbungsmethoden folgen fast alle dem Prinzip der Tuberkelbacillenfärbung. Schon *R. Koch* (c, S. 34 und Tafel V, Fig. 23) stellte gelegentlich der Färbung von Tuberkelbacillen fest, daß sich die

Sporen eines Bacillus mit Anilinwassermethylviolett ebenso wie die Tuberkelbacillen blau gefärbt hatten, während die zugehörigen vegetativen Formen die Nachfärbung (braun) annahmen. Allgemein eignete sich aber diese Methode, wie *Gaffky* zeigte, zur Sporendarstellung nicht. 1884 wandte *A. Neisser* zur Sporenfärbung Anilinwasserfuchsin an und färbte mit Methylenblau nach, damit war eine Doppelfärbung: Sporen rot, Bacillen blau, erzielt. Im gleichen Jahre stellte *H. Buchner* fest, daß Sporen für Farben zugänglich gemacht werden konnten, wenn er die Deckglastrockenpräparate eine Stunde bei 120° im Dampf oder $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde bei etwa 200° im Trockenschrank erhitzte. Das gleiche erreichte er durch 15 Sekunden lange Vorbehandlung mit konzentrierter Schwefelsäure und nachfolgendem sorgfältigen Auswaschen oder durch Einlegen in konzentrierte Kalilauge: durch alle diese Maßnahmen erreichte er eine isolierte Färbung der Sporen, die vegetativen Formen nahmen dann den Farbstoff kaum mehr an. Unabhängig von *Buchner* kam *F. Hueppe* zu ähnlichen Resultaten, dem ebenso wie *A. Neisser* die ersten Doppelfärbungen von Präparaten mit endogenen Sporen glückten. *F. Hueppe* benutzte Anilinwasserfuchsin mit Methylenblauachfärbung oder Anilinwassermethylviolett mit Vesuvingegenfärbung. Er stellte auch fest, daß sich die Sporen leichter färben, wenn man das Trockenpräparat, je nach Art, 7 oder 10mal durch die Flamme zieht, ein Verfahren, bei welchem allerdings die Gegenfärbungen bestimmter Arten vegetativer Bakterien leiden können. Dasselbe gilt von den übrigen oben genannten Prozeduren, welche von *Buchner* angewandt wurden: sie alterieren die in dem Präparat noch vorhandenen vegetativen Formen in hohem Maße, die dann mißgestaltet erscheinen und die Gegenfarbe schlecht oder nicht annehmen.

I. Sporendarstellung durch Kochen in Farblösungen.

Als Farbe ist am empfehlenswertesten *Ehrlichs* Anilinwasserfuchsin, frisch hergestellt. In zweiter Linie kommt das konzentrierte Carbol-fuchsin in Betracht. Da man mehrmals aufkochen muß, so färbt man nicht direkt auf dem Deckglas oder Objektträger, sondern man benutzt Uhrschildchen oder Porzellanabdamfischalen für Deckglaspräparate, Porzellantiegel für die Objektträgerfärbungen. Man darf mit der Farbe nicht sparen: nimmt man zu wenig, so wird die Farbe durch das Eindampfen zu konzentriert, es bilden sich dann Niederschläge, die der Entfärbung unter Umständen länger trotzen als die Sporen. Uhrschildchen oder Abdampfischalen kann man direkt über der Sparflamme des Bunsenbrenners oder über einem Mikrobrenner erhitzen, man hält sie mit Pinzette, namentlich die *Cornet*-Pinzette eignet sich hierzu. Man kann aber auch die Schälchen auf Dreifuß mit Drahtnetz (mit oder ohne Asbesteinlage) stellen. In jedem Falle muß man sehr vorsichtig und langsam erhitzen, um das Springen der Schälchen zu vermeiden. Deshalb bewegt man das über die Flamme gehaltene Schäl-

chen langsam entweder in vertikaler oder horizontaler Richtung, um eine gleichmäßige Erwärmung herbeizuführen.

Sporenfärbung. Empfehlenswerte Vorschrift.

1. Sporenmaterial ist reichlich aufzutragen. Das lufttrockene Präparat wird dreimal durch die Flamme gezogen (z. B. Milzbrand; bei Subtilissporen 10mal); 2. einlegen in heißes frisches Anilinwasserfuchsin und vorsichtig erhitzen bis zur Blasenbildung; 3. warten 1—2 Minuten, dann wieder erhitzen, bis Blasen springen. Wieder warten, dann wieder aufkochen. In der Regel genügt vier- bis fünfmaliges Aufkochen. Bei stärkerem Eindampfen ist neue Farbe zuzufügen; 4. ohne abzuspülen Farbe abfließen lassen, Präparat kurz in absoluten Alkohol eintauchen; 5. darnach 60%iger Alkohol, bis beinahe keine Farbe mehr abgeht; 6. trocknen mit Fließpapier; 7. nachfärben mit wässriger Methylenblaulösung 3—5 Minuten; 8. Wasserspülen, trocknen, Balsam.

Hat man Zeit, so kann man auch bei Zimmertemperatur die Sporenpräparate einen Tag in dem Anilinwasserfuchsin oder Carbofuchsin liegen lassen. Die empfohlene Methode ist jedenfalls hinsichtlich Färbung und Entfärbung die schonendste, sie vermeidet eine rigorose Vorbehandlung, unter welcher oft genug die Tinktionsfähigkeit der vegetativen Formen leidet, und erhöht die Sicherheit des Gelingens durch Umgehen entfärbender Säuren, die oft genug zu stark entfärbend wirken und zudem der Dauerhaftigkeit der Konservierung schaden.

Sind die Präparate dicker und schwerer entfärbbar, so nimmt man an Stelle des absoluten Alkohols (unter 4) den bei der Tuberkelbacillenfärbung gebräuchlichen 1%igen salzsauren Alkohol: man läßt ihn höchstens 2 Sekunden einwirken und spült dann die Säure in mehrfach erneuertem 60%igen Alkohol ab. Nimmt man nur ein Schälchen mit diesem Alkohol, so wird dieser ja durch die übertragene Säure angesäuert, wodurch einmal eine zu starke Entfärbung und weiterhin ein ungenügendes Auswaschen der Säure aus dem Präparat stattfinden kann, die Folge davon ist mangelhafte Nachfärbung und geringe Haltbarkeit des Präparates.

K. Günther bringt nach sechsmaligem Aufkochen in Anilinwasserfuchsin das Präparat direkt für 1 Minute in 3%igen Salzsäurealkohol, in welchem es hin- und herzubewegen ist. Darnach abspülen mit Wasser, kurze Gegenfärbung mit wässrigem Methylenblau.

Bei Anwendung von Säure jeder Art ist aufs sorgfältigste für Entfernung der Säure Sorge zu tragen, sonst wird die Gegenfarbe schlecht angenommen und die Haltbarkeit der Präparate ist eine schlechte.

Hausers Verfahren ist ebenfalls das der Hitzeeinwirkung: er färbt mit wässriger Fuchsinlösung und zieht das mit Farbe versehene Präparat 40—50mal durch die Flamme (Ersatz der verdampften Lösung durch neue). Entfärben in 25%iger Schwefelsäure. Wasserspülen. Gegenfärben mit wässrigem Methylenblau.

Methode ohne Entfärbung (Farbverdrängung):

Verfahren von *Waldmann*.

1. Das fixierte Präparat 1—2 Minuten unter Aufkochen färben in einer 0·2%igen wässrigen Methylenblaulösung, die mit KOH (0·01%) versetzt ist; 2. gründliches Abspülen mit Wasser oder kurzes Erwärmen unter Wasser; 3. gegenfärben mit verdünntem Carbofuchsin (kurz).

Die Farblösung ist vor Gebrauch frisch herzustellen.

Im Gegensatz zu den meisten Autoren, die gerade Carbofuchsin für die Färbung der Sporen bevorzugen, schlägt *R. Wirtz* vor, diese Farblösung nur zur Gegenfärbung zu benutzen, vielmehr *Malachitgrün* anzuwenden, das schneller in die Sporen eindringt.

Färbung nach *Wirtz*.

1. Fixieren 10—20 Sekunden in Osmiumsäuredampf (Röhre von *Hamm*); 2. übergießen mit 5%iger Malachitgrünlösung, bis Dämpfe aufsteigen; 1 Minute warten; nochmals erhitzen, nach einer weiteren halben Minute 3. mit fünffach verdünnter Carbofuchsinlösung abspülen und sofort 4. gründlich Wasser spülen.

R. Wirtz sah von dieser Methode besonderen Nutzen bei Färbung von Eiterausstrichen (Tetanus), er hält sie auch anwendbar für Präparate, die vorher nach *Gram* gefertigt waren.

C. Botelho färbt in einer Mischung von Essigsäure, Lichtgrün und Fuchsin. Er nimmt 50 cm³ Acid. acet. pur. cryst. + 50 cm³ Aqua dest. und löst hierin 4 g Lichtgrün und 2 g Säurefuchsin. Hierin sind die Präparate 3—4mal bis zur Dampfbildung zu erhitzen. Darnach Differenzierung in destilliertem Wasser, bis die violette Färbung einen grünlichen Ton annimmt. Die Prozedur wird noch 2—3mal wiederholt. Bacillen grün, Sporen rot.

Von Desinfektionsversuchen her wissen wir, daß in Flüssigkeiten suspendierte oder überhaupt feuchte Bakterien leichter von Desinfektionsmitteln angegriffen werden als trockene. Es war naheliegend, ein analoges Verhalten der Bakterien auch gegenüber Färbemitteln zu vermuten. In der Tat sind feuchte Bakterien sehr leicht zu färben, leichter als trockene. Auch bei Färbung von Sporen spielt der physikalische Zustand eine Rolle. Sporen im feuchten Zustand lassen sich leicht färben. Dies macht sich die Methode von *A. Klein* zu nutze.

Sporenfärbung nach *A. Klein*.

1. Das sporenhaltige Material wird in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und mit gleichen Teilen konzentrierten Carbofuchsin versetzt; 2. erwärmen bis Dampf aufsteigt, etwa 6 Minuten; 3. eine Platinöse davon austreichen, lufttrocken werden lassen, zweimal durch die Flamme ziehen; 4. entfärben in 1%iger Schwefelsäure 1 bis 2 Sekunden; 5. abspülen in Wasser; 6. nachfärben mit verdünnter wässrig-alkoholischer Methylenblaulösung 3—4 Minuten (ohne Erwärmen). Abspülen in Wasser trocknen, einschließen.

Ganz ähnlich ist die Methode von *H. Marx*.

Tribondeau beizt mit *Lugolscher* Lösung unter 2—3maliger Erwärmung bis zur Dampfbildung, wäscht und färbt mit Carbolkrystallviolett unter 2—3maliger Erwärmung. Wasserspülen, nachfärben mit Vesuvín 1 : 500 1—2 Minuten. Wasserspülen, trocknen.

II. Kochen in Farblösungen nach voraufgehender Beizung.

H. Möller schickt der Sporenfärbung eine Beizung oder Maceration mit Chlorzinkjod (gesättigte Lösung) oder besser Chromsäure (5%ige Lösung) voraus, um die Membran zugänglich für Farbstoffe zu machen.

Methode Möller.

1. Nach dem Fixieren in der Flamme 5 Sekunden bis 10 Minuten mit 5%iger wässriger Chromsäurelösung vorbehandeln; 2. abspülen in Wasser; 3. färben mit Anilinwasserfuchsin oder konzentriertem Carbolfuchsin 1 Minute unter Aufkochen; 4. 5%ige Schwefelsäure bis zur Entfärbung; 5. abspülen in Wasser; 6. nachfärben mit dünner Methylenblaulösung (oder Malachitgrün) 30 Sekunden, Wasserspülen, trocknen, einlegen.

Um nicht durch rotgefärbte Fetttropfen od. dgl. getäuscht zu werden, kann man den Sporenausstrich vor der Chromsäurebehandlung 2 Minuten in Chloroform halten, darnach Wasserspülen u. s. w.

Für jede Sporenart ist die Dauer der Beizung auszuprobieren. In der Regel kommt man mit einer 5 Minuten langen Chromsäurebehandlung aus. Bei sehr empfindlichen Sporen nehme man das milder wirkende Chlorzinkjod.

Diese Methode ist empfehlenswert, natürlich kann man länger färben und häufiger aufkochen u. s. w.

Trincas (b) ändert die Methode Möllers wie folgt ab: (Nach 3.) 4. entfärben mit 10%igem unterchlorsauren Kalk (Calciumhypochlorit); 5. gründlich waschen; 6. einige Sekunden in 40%igem Formalin; 7. gründlich waschen; 8. färben mit Chrysoidin 1 : 300.

Sporen rotbraun, Bacillen gelb.

Verfahren von *Aujeszký*.

1. Präparat lufttrocken, unfixiert mit beladener Seite nach unten auf eine heiße im Porzellanschälchen befindliche 0.5%ige Salzsäure auflegen. Mehrere Minuten darin belassen; 2. Wasserspülen, trocknen, fixieren; 3. färben mit Anilinwasserfuchsin oder konzentriertem Carbolfuchsin 1 Minute unter Erwärmen, bis mehrmals Dämpfe aufsteigen. 1—2 Minuten warten; 4. entfärben mit 4—5%iger Schwefelsäure, wenige Sekunden; 5. Wasserspülen; 6. gegenfärben mit Methylenblau oder Malachitgrün 2—4 Minuten; 7. Wasserspülen, trocknen.

Für leicht entfärbbare Sporen (*Bac. pulpae gangraenosus*) ist eine mildere Entfärbung mit 1%iger Schwefelsäure zu empfehlen.

Methode von *Thesing*.

1. Präparat, in Flamme fixiert, mit Platinchlorid 1 : 100 erhitzen bis Blasen springen; 2. abspülen mit Wasser, trocknen zwischen Fließ-

papier; 3. konzentriertes Carbofuchsin unter einmaligem Aufkochen oder kalt 5 Minuten; 4. abgießen, nicht Wasserspülen. Übergießen mit 33%igem Alkohol. Sofort abspülen mit Leitungswasser, trocknen; 5. gegenfärben mit *Löfflers* Methylenblau 3 Minuten kalt. Abspülen, trocknen, Balsam.

Eine schnell ausführbare gute Methode.

Verfahren von *Ország*.

Prinzip: Vorbehandlung der Sporen mit Mischung von Natrium salicylicum und Essigsäure, die letztere soll die etwas schrumpfende Wirkung der Salicyllösung aufheben. Natrium salicylicum 0.5%ige Lösung 4 Teile, 5%ige Essigsäure einen Teil, eine Woche haltbar. Verfahren: 1. Von der essigsäuren Natriumsalicyllösung kommt ein Tropfen auf ein Deckglas, hierin Sporenmaterial verteilen, Tropfen ausbreiten. Er muß nach kurzer Zeit trocknen; 2. fixieren in Flamme (dreimal); 3. bedecken mit konzentriertem Carbofuchsin. Erwärmen bis zur Dampfbildung. Warten. Wieder erhitzen u. s. w. im ganzen 2 Minuten lang; 3. entfärben mit 1%iger Schwefelsäure bis zur schwachen Rosa-farbe; 4. Wasserspülen; 5. nachfärben mit 1%igem wässerigen Methylenblau oder Malachitgrün 2 Minuten; 6. Wasserspülen, trocknen, Balsam.

Ország vereinigt 3—5, indem er 2 Minuten lang mit einer Schwefelsäure-Methylenblaulösung (gesättigte Lösung von Methylenblau in 1%iger Schwefelsäure) behandelt, dann 6.

Bei *B. mesentericus* und *B. alvei* ist die Einwirkungszeit von 1. und 3. auf 8—10 Minuten auszudehnen.

Bitter ersetzt die Chromsäure durch Formalin, das er konzentriert oder in 10%iger Lösung mindestens 10 Minuten lang vor der Färbung auf die Ausstriche einwirken läßt. (Derselbe Autor konserviert flüssige Kulturen mit Sporen zum Zweck der Färbung, indem er 4% Formalin zusetzt.)

Bitter bemühte sich auch die bei den Sporenfärbungen übliche Anwendung von Säuren für die Entfärbung zu vermeiden durch Anwendung von verdrängenden Farbstoffen. Er wählte hierfür Safranin nach Färbung der Sporen mit alkalischem Methylenblau.

Bitters Methode.

1. Vorbehandlung des unfixierten Objektträgerausstriches 10 Minuten lang mit Formalin; 2. kräftiges Abspülen in fließendem Wasser, trocknen; 3. Färbung mit alkalischem Methylenblau (30 cm^3 konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung + 100 cm^3 0.02%ige KOH) unter mehrmaligem kräftigen Aufkochenlassen 3 Minuten lang; 4. abspülen in fließendem Wasser, trocknen; 5. nachfärben mit Safranin (1 Teil konzentrierte alkoholische Lösung + 4 Teile Wasser) oder Bismarckbraun (1 Teil einer gesättigten Lösung in Wasser und Glycerin aa + 2 Teile Wasser) 3—5 Minuten; 6. abspülen in Wasser, trocknen.

Später wählte *Bitter* Ammoniakmethylenblaulösung an Stelle der Kalilaugenfarbe. Herstellung: 20 cm^3 konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung und 3—4 cm^3 reines Ammoniak, dann Zusatz von 80 cm^3 Aqua dest. Die Lösung ist bei gutem Verschuß jahrelang haltbar.

Sporenfärbung nach *J. Lagerberg*.

1. Nach Fixation übergießen mit gesättigter Kupfersulfatlösung (auf Objektträger); 2. unter vorsichtigem Erwärmen über kleiner Flamme tropfenweise konzentrierte Ammoniaklösung zusetzen bis zur völligen Lösung des ausgefällten Kupfersulfates. Unter weiterem Erwärmen noch 1—2 Tropfen Kupfersulfat hinzufügen. 30 Sekunden einwirken lassen; 3. auswaschen mit Ammoniak, Wasserspülen; 4. Färbung mit Carbofuchsin unter 1—2maligem Aufkochen; 5. entfärben in 3—5% iger Schwefelsäure 1—2 Sekunden; 6. Wasserspülen. Gegenfärbung unnötig, da die Bakterien bläuliche Farbe zeigen. Die Methode gibt auch bei ganz jungen Kulturen sowie asporogenen Stämmen (Milzbrand) säurefeste Granula wieder.

Lagerberg ging davon aus, daß die Sporenmembran möglicherweise einen celluloseähnlichen Stoff enthält und daß zur Auflockerung der Sporenmembran celluloselösende Mittel geeignet sein müßten. Die fertige Kupferoxydammoniaklösung erwies sich aber als unwirksam.

Literatur: *Aujesky*, Zbl. f. Bakt., XXIII. — *Beauverie J.*, Compt. rend. Soc. de biol. 1917, LVVV. — *Bender W.*, Zbl. f. Bakt. 1921, Orig. LXXXVI. S. 461. — *Benignetto u. Gino*, Bull. Pasteur 1906, p. 942. — *Bitter L.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LXVIII, S. 227. — *Boni J.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., XXVIII, S. 705. — *Botelho C.*, Compt. rend. Soc. de biol. 1918, S. 183. — *Buchner H.*, Ärtzl. Intell.-Bl. 1884, Nr. 33, S. 370. — *Bunge*, Fortschr. d. Med. 1894, Nr. 12, 17, 24. — *Bürger L.*, Zbl. f. Bakt. 1905, Orig. XXXIX, S. 216. — *Carpano M.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LXX, S. 42. — *Casares-Gil*, Revista de Sanidad militar 1912, nach *B. Galli-Valerio*. Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. LXXVI, S. 233. — *Czaplewski*, D. med. Woch. 1917, Nr. 43, S. 1347. — *van Ermengem*, Ref. Zentralblatt für Bakteriologie, XV, S. 969. — *Fischer A.*, Pringsh. Jahrb. f. wiss. Bot. 1894, S. 187; ebenda 1895, S. 1. — *Frank*, zit. nach *Glage*, Kompendium d. angew. Bakt. f. Tierärzte, S. 59. R. Schoetz. Berlin 1910. — *Friedländer*, Mikrosk. Technik. Herausg. v. Eberth, Berlin 1900. — *Gemelli E.*, Zbl. f. Bakt. 1903, XXXIII, H. 4. — *Gins H. A.*, Zbl. f. Bakt. 1911, LVII, H. 5, S. 472 (Anhang). — *Günther C.*, Einführung in das Studium der Bakterien 1898. — *Hamm A.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. XLIII, S. 287. — *Hauser*, M. med. Woch. 1887, Nr. 34. — *Heim, A. f. Hyg.* 1901, 40; M. med. Woch. 1904, S. 426; Lehrbuch der Bakteriologie 1911, 4. Aufl. — *Hinterberger*, Zbl. f. Bakt., XXVII, S. 597; XXX, S. 417; XXXVI, S. 480. — *Hiß*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1902; Ref. XXXI, S. 302. — *Hoffmann R.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Orig. XLVI, S. 219. — *Hueppe F.*, Die Methoden der Bakterienforschung. 3. Aufl., Wiesbaden 1886. — *Johné*, D. Zt. f. Tiermed. 1893, XIX. — *Kaufmann*, Hyg. Rundschau 1898, S. 873. — *Klein A.*, Zbl. f. Bakt. 1899, XXV, S. 376. — *Klett R.*, Inaug.-Diss. Gießen 1894; D. tierärztl. Woch. 1894, II. — *Koch R.*, Cohns Beitr. z. Biol. d. Pflanzen 1877, II, S. 401; Mitt. a. d. kais. Ges. 1881, I, S. 5; ebenda 1884, II. — *Kuntze W.*, Zbl. f. Bakt. 1902, XXXII, S. 555. — *Lagerberg J.*, Zbl. f. Bakt., Orig. LXXIX, S. 191. — *Löffler F.*, Zbl. f. Bakt. 1889, VI, S. 209; 1890, VII. — *Meyer A.*, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. Jena 1903; Die Zelle der Bakterien. Jena 1912. — *Möller H.*, Zbl. f. Bakt. 1891, X, Nr. 9, S. 273. — *Neuhaß*, Zbl. f. Bakt., V, Nr. 3. — *Nicolle*, Ann. Pasteur 1895, IX. — *Noetzel*, Fortschr. d. Med. 1896. — *Olt*, D. tierärztl. Woch. 1899. —

Ország O., Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1906, Orig. **XLI**, S. 397. — *Peppler A.*, Zbl. f. Bakt. 1901, **XXIX**, S. 345. — *Preisz H.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. **XLIX**, S. 341. — *Preuße*, zit. bei *Glage*, Komp. d. angew. Bakt. f. Tierärzte 1910, S. 58. — *Rübiger*, Zt. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1901; Berl. tierärztl. Woch. 1907. — *Ribbert*, D. med. Woch. 1885. — *Riemsdijk M. van*, Zbl. f. Bakt. 1921, Orig. **LXXXVI**, S. 177. — *de Rossi*, A per le Scienze Med. 1900, **XXIV**, p. 297. — *Rulison*, J. of Amer. med. Assoc. 1910, 30. April; Ref. D. med. Woch. 1910, S. 1048. — *Serafini*, Estratto del Congresso medico. Napoli 1888: zit. bei *Preisz*. — *Stephens J. W.*, The Lancet 1898, 1. Okt. — *Thesing E.*, A. f. Hyg., **L**. — *Toenniessen E.*, Zentralblatt für Bakteriologie. I, 1912, Orig. **LXV**, S. 3. — *Trenkmann*, Zbl. f. Bakt., **VIII**, S. 385. — *Tribondeau L.* (en coll. avec *M. Fichet* et *J. Dubreuil*), Compt. rend. Soc. de biol. 1916, **LXXIX**, p. 710. — *Tribondeau L.* et *Dubreuil J.*, Compt. rend. Soc. de biol. 1917, **LXXX**, S. 331. — *Tribondeau L.*, Compt. rend. Soc. de biol. 1917, S. 880. — *Trincas*, Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, **XLI**, Nr. 7/10; Orig.: Soc. delle sc. med. e nat. di Cagliari 1907. — *Valenti G. L.*, Zbl. f. Bakt. 1902, **XXXII**, Nr. 24. — *Waldmann*, Berl. tierärztl. Woch. 1911. — *Welch*, Bull. John Hopk. Hosp. 1892, S. 125. — *Wirtz R.*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Orig. **XLVI**, S. 727. — *Zettnow*, Zbl. f. Bakt. 1891, **XI**, S. 689; Zt. f. Hyg., **XXX**; Klin. Jahrb. 1907; Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. **LXXVII**, S. 209.

Methoden zur Färbung der Protozoen.

Von Prof. Dr. **Giemsa**, Hamburg.

Mit 3 Textabbildungen.

Die färberische Darstellung der Protozoen baut sich auf denselben Grundsätzen auf, welche für die allgemeine histologisch-mikroskopische Färbetechnik maßgebend sind, d. h. hier wie dort gilt es, den Färbungs- und Fixierungsprozeß so zu gestalten, daß die ursprüngliche im Leben vorhandene Form und Masse der Zelle möglichst erhalten bleibt. Nur ein diesen Forderungen Rechnung tragendes Verfahren wird imstande sein, jene feineren Strukturdifferenzen zum Ausdruck zu bringen, die häufig, wie z. B. bei den Amöben, die einzigen Anhaltspunkte geben, um harmlose Arten von solchen pathogener Natur zu unterscheiden. Die Schwierigkeiten einer solchen subtilen Differenzierung steigen natürlich mit der Kleinheit der Mikroorganismen und machen es zur Notwendigkeit, sich in allen Fällen, in denen es sich um die Deutung fraglicher Gebilde handelt, nicht mit einem einzigen Fixierungs- und Färbeverfahren zu begnügen, sondern ausgiebigsten Gebrauch von anderen Methoden zu machen, wobei vor allem Fixierungsmittel heranzuziehen sind, welche vorwiegend physikalisch (Alkohol, Methylalkohol, Aceton) wirken und welche die ursprüngliche, natürliche Affinität der Parasitenzelle zu den Farbstoffen nicht verändern.

Neben dem Studium des gefärbten Präparates wird weiterhin die vergleichende Beobachtung des un- (eventuell auch vital-) gefärbten Objektes im abgeblendeten Mikroskope oder im Dunkelfeld oft zur unumgänglichen Notwendigkeit werden. Mit Vorsicht werden stets solche Gebilde zu beurteilen sein, welche im ungefärbten Objekt nicht einmal angedeutet erscheinen.

I. Fixierungs- (Härtungs-) Mittel.

Mit der Fixierung bereiten wir die Protozoenzelle für die später zu erfolgende Färbung vor, indem wir ihr unter möglicher Erhaltung ihrer im Leben vorhandenen Gestalt einen gewissen Widerstand verleihen gegen alle Eingriffe, welchen sie bis zur Fertigstellung des gefärbten mikroskopischen Präparates ausgesetzt ist. Diese Resistenz soll sich hauptsächlich darin äußern, daß alles, was mit einer Deformation der Zelle in kausalem Zusammenhange steht (Lösungs-, Quellungs-,

Schrumpfungerscheinungen, Zersetzungs Vorgänge), nach Möglichkeit vermieden wird. Nur selten färbt man ohne einen vorhergegangenen Härtungsprozeß, u. zw. in der Regel dann, wenn es sich um die Feststellung bekannter, leicht diagnostizierbarer Protozoen handelt, und wenn deren einhüllende Medien schon durch bloßes Eintrocknen (infolge Ausscheidung von Fibrin u. dgl.) dem zu färbenden Material einen genügenden Widerstand gegen ein Abschwemmen während der Nachbehandlung verleihen (s. Dicktropfenverfahren S. 366 und Schnellfärbung nach **Rocha-Lima** S. 370).

Von den zahlreichen Fixierungsmitteln seien nachstehend die wichtigsten aufgeführt:

1. **Alkohol** differenziert weder Kerne noch Plasma besonders gut, hat aber, ebenso wie Aceton, Methylalkohol und Äther vor den meisten anderen Fixierungsmitteln den sehr bemerkenswerten Vorteil, daß er die Zelle nur physikalisch durch Wasserentziehung härtet unter Erhaltung ihrer ursprünglichen Affinität zu verschiedenen Farbstoffklassen. Seine Verwendung ist daher hauptsächlich dann angezeigt, ja gewissermaßen unentbehrlich, wenn es darauf ankommt, die einzelnen Zellbestandteile auf ihre natürliche Chromophilie zu prüfen. Die stärkeren Konzentrationen (96—100%), welche schnell abtöten und mit ziemlicher Tiefenwirkung fixieren, aber leicht Schrumpfungen verursachen, benutzt man gewöhnlich, um rasch Übersichtsfärbungen für diagnostische Zwecke zu erzielen. Die schwächeren (60, 70, 90%) — in aufsteigender Reihe bis zum Alkohol absolutus angewendet — wirken schonender, weniger schrumpfend, aber viel langsamer und sind bezüglich der schnellen Abtötung nicht zuverlässig. Sie leisten hauptsächlich bei der Fixierung bereits abgestorbenen Materials gute Dienste. Hat man keine Gelegenheit, die ausfixierten Stücke sogleich in Paraffin zu betten, so kann man sie in 60%igem Alkohol aufbewahren. Hierbei ist jedoch zu bemerken, daß Kern wie Plasma selbst in diesem indifferenten Medium oft schon nach wenigen Tagen ihr ursprüngliches Elektionsvermögen gewissen Farbstoffen gegenüber verlieren können.

2. **Aceton** wirkt energischer, im übrigen aber ganz ähnlich wie Alkohol. Wegen seiner Eigenschaft, besonders stark und schnell zu entwässern, kann er bei der sog. Nachhärtung nützliche Dienste leisten. Bei längerem Verweilen in absolutem Aceton schrumpft jedoch das Material sehr leicht, auch wird es sehr spröde und infolgedessen für die Herstellung dünner Schnitte wenig geeignet.

3. **Methylalkohol** leistet annähernd dasselbe wie Aceton.

4. **Äther** wird nie allein benutzt, weil er mit Wasser nicht in jedem Verhältnis mischbar ist und daher auch nicht in die wasserreichen Organstücke einzudringen vermag. Meist verwendet man ihn zu gleichen Teilen mit A l c. a b s. v e r m i s c h t. Ein solches Gemisch tötet schnell und fixiert energisch, wirkt aber bei Schnitten und Feuchtpräparaten stark schrumpfend. Dagegen übt es diese nachteilige Wirkung nicht bei

Trockenausstrichen aus und wird dort, namentlich wenn es sich um Schnelldiagnosen handelt, viel gebraucht. Eine Fixierung von 2 bis 3 Minuten genügt für diese Zwecke gewöhnlich.

5. **Sublimat** (Quecksilberchlorid), löslich in Wasser (kaltes löst 7, heißes 54, Alkohol 33, Äther 25%). Kochsalz und Chlorammonium, mit denen es Doppelsalze bildet, erhöhen seine Wasserlöslichkeit erheblich.

Sublimat gilt im allgemeinen als eines der besten Fixierungsmittel. Es tötet schnell, hat eine gute Tiefenwirkung und differenziert Kern und Plasma sehr gut. Es läßt sich nach Ausübung der Wirkung durch Jod leicht aus den Präparaten wieder entfernen und schont — allein oder in Verbindung mit anderen indifferenten Härtungsmitteln angewendet — die natürliche Chromophilie der Zelle am meisten von allen chemisch wirkenden Fixierungsflüssigkeiten, unter der Voraussetzung, daß das überschüssige, bei der Nachbehandlung vom Präparat gebundene Jod — am besten durch Natriumthiosulfat (*Heidenhain, Giemsa*) — wieder beseitigt wird.

Beim Gebrauch von Sublimat oder Sublimatgemischen ist folgendes zu beachten:

Metallpinzetten jeder Art sind zu vermeiden, am besten eignen sich Pinzetten aus Horn oder Elfenbein.

Schnitte müssen möglichst dünn sein (nicht über 5 μ).

Die Fixierungsgefäße müssen, namentlich während einer Dauerbehandlung mit konzentrierten Lösungen durch Glas- oder Gummistöpsel gut verschlossen sein, da sonst höchst lästige krystallinische Sublimatausscheidungen unvermeidlich sind. Sind solche entstanden, so behandelt man das Material vor der Jodierung entweder längere Zeit (24 Stunden) mit destilliertem Wasser oder noch besser mit 70%igem Alkohol.

Zum Entquecksilbern der Präparate benutzt man entweder dünnen Jodalkohol (1—2 cm^3 der offizinellen Jodtinktur auf 100 cm^3 60%igen Alkohol) oder wässrige bzw. alkoholhaltige Jodjodkaliumgemische, zur Entfernung des Jods Natriumthiosulfat (s. S. 371).

In der Protozoologie bevorzugt man folgende sublimathaltige Fixierungsflüssigkeiten, von denen die Mehrzahl auch in der allgemeinen Histologie Anwendung findet.

a) Konzentrierte wässrige Sublimatlösung (70%ige).

b) Sublimatalkohol nach *Schaudinn*.

Sublimat (konzentrierte wässrige Lösung) 2 Teile + Alc. abs. 1 Teil. Gibt — namentlich warm (bei 60—70°) angewendet — vorzügliche Konservierung der chromatischen Substanz und gestattet, weil Sublimat in Alkohol weit löslicher als in Wasser ist, eine Dauerkonservierung, ohne daß sich im Material Krystalle abscheiden.

c) **Sublimat-Alkohol-Eisessig** nach *Schaudinn*. Sublimat konzentriert wässerig 100 cm^3 , Alc. abs. 50 cm^3 , Eisessig 5 cm^3 . Fixiert Granulationen besonders gut, ebenso:

d) **Sublimat-Eisessig** nach *Borgert*. Sublimat, konzentrierte wässrige Lösung 10 Teile, Eisessig 2—3 Teile.

e) **Zenkersches Gemisch**. Sublimat 5 g, Kaliumbichromat 2.5 g, Natrium sulfuric. 1 g, Aq. destill. 100 g.

Dieser Lösung, welche warm zu bereiten ist, setzt man kurz vor dem Gebrauch 5 Teile Eisessig zu.

6. **Formalin** (40%ige wässrige Lösung von Formaldehyd) wird nur im verdünnten Zustand (1 Teil Formalin + 9 Teile Wasser oder Alkohol 96%) gebraucht. Fixierdauer 3—24 Stunden oder länger. Nachhärtung in Alkohol meist entbehrlich, nur bei Carminfärbung nötig (*Schmort*). Es fixiert schnell, seine differenzierende Wirkung ist aber mäßig. Bisweilen ruft es in den Schnitten dunkle Niederschläge hervor, die — namentlich bei Pigmentstudien — sehr störend wirken. Es läßt fast alle Färbemethoden zu, nur die *Romanowsky*-Färbung mit ihrer „typischen“ roten Chromatintinktion gelingt selten, sobald das Mittel längere Zeit, wie es Schnitte erfordern, eingewirkt hat. Formalin-behandelte Schnitte kommen daher für diese Färbung überhaupt kaum in Betracht, sondern höchstens Trockenausstriche, u. zw. auch nur dann, wenn sie nicht länger als 2—3 Minuten fixiert und nachher gründlich gewaschen worden sind.

Levaditi gebraucht die wässrige Verdünnung (1 Teil Formalin plus 10 Teile Wasser) mit Vorteil als Fixierungsmittel bei der nach ihm benannten Spirochätenversilberung in Schnitten (s. S. 374).

Reuter empfiehlt die alkoholische Verdünnung (10 Teile Formalin und 90 Teile Alkohol) als Schnellfixiermittel für Malaria blutausschläge (*Romanowsky*-Färbung), *Ross* zu gleichen Zwecken (Tropfenmethode) ein Gemisch aus Formalin (2%ig) und Essigsäure ($\frac{1}{2}$ %ig).

Das *Ortsche Gemisch*, aus 1 Teil Formalin und 10 Teilen *Müllerscher Flüssigkeit* (s. S. 363) bestehend, findet auch öfter Verwendung und ist stets frisch zu bereiten, da es schon nach wenigen Tagen verdirbt.

7. **Osmiumsäure** (Osmiumtetroxyd) wird in Form ihrer flüchtigen Dämpfe oder in wässriger Lösung verwendet. Vor allem sind Mischungen von Osmiumsäure und anderen Fixiermitteln viel benutzt. Mit der lebenden Zelle in Verbindung gebracht, bringt sie diese augenblicklich zum Absterben und fixiert hierbei das Plasma, insbesondere auch die sonst sehr leicht deformierbaren lokomotorischen Organe so gut wie kein anderes Mittel. Eine besondere Tiefenwirkung übt sie indessen nicht aus, auch ist die Differenzierung der chromatischen Substanz nicht besonders gut, sofern Osmiumsäure allein angewendet wird. Dagegen leisten einige Gemische auch nach dieser Richtung hin Vorzügliches. Fett wird durch Osmiumtetroxyd — infolge Reduktion zu metallischem

Osmium bzw. niederen Oxyden — geschwärzt. Lipoide nehmen dagegen nur einen grauen Farbenton an. Auch in anderem Organmaterial wird die aufgenommene Osmiumsäure, sofern sie allein und nicht in Verbindung mit anderen Fixiermitteln einwirkt, allmählich, im direkten Sonnenlichte schneller unter Schwärzung reduziert. Deshalb ist die Fixierung in solchen Fällen möglichst im Dunkeln vorzunehmen und die überschüssige Säure durch ausgiebiges Nachwaschen mit Wasser zu entfernen. Bereits reduziertes Osmium kann man durch eine Reihe oxydierender Mittel wieder aus den Präparaten entfernen. Näheres hierüber s. in *Lee* u. *Mayer* und unter *Széczi* S. 364. Nach eigenen Erfahrungen kommt man hierbei sehr gut zum Ziel durch mehrstündiges Einwirkenlassen einer frisch verdünnten Lösung des völlig neutralen Perhydrol (*Merck*), welche 5%iges Wasserstoffsuperoxyd enthält.

In Dampfform ist die Osmiumsäure vorzüglich für die Fixierung dünner Objekte (Feuchtausstriche) geeignet. Gegenüber den flüssigen Osmiumsäuregemischen hat der Dampf den Vorzug, daß bei seiner Einwirkung Veränderungen durch Osmose vollständig in Wegfall kommen.

Die Fixierung nimmt man am besten in einem ca. 10 cm hohen und 5 cm weiten Glaszylinder mit sehr gut eingeschliffenem Stöpsel vor, nachdem man in das Gefäß 0.25—0.5 g krystallisiertes Osmiumtetroxyd und darüber so viel Glassechrot hineingeschüttet hat, daß der Boden des Zylinders hiermit vollständig bedeckt ist. Um einem nutzlosen Entweichen der im übrigen sehr giftigen und die Schleimhäute äußerst stark reizenden Dämpfe bei Nichtbenutzung vorzubeugen, reibt man den Stöpsel mit etwas Vaseline ein. Diese absorbiert zwar sehr bald einen Teil des Dampfes unter Schwärzung, nach völliger Sättigung hält sich dafür der Rest der Fixiersubstanz umso besser. Um zu fixieren, öffnet man — unter dem Abzuge! — den Stöpsel, führt den frischen, noch feuchten Objektträgersausstrich schnell in den Zylinder ein und schließt das Gefäß sofort wieder. Schon nach wenigen (5—10) Sekunden ist das Material, dessen Feuchtigkeit im geschlossenen Gefäß nur sehr langsam verdunstet, genügend fixiert und kann — am besten unter Nachhärtung in Alkohol steigender Stärke und darauffolgender Eliminierung des reduzierten Metalles durch oxydative Mittel — je nach Belieben als Feucht- oder Trockenpräparat weiter behandelt werden.

Osmiumsäuregemische:

a) *Flemmingsches* Gemisch. 15 Teile 1%iger Chromsäure, 4 Teile 2%iger Osmiumsäure, 1 Teil (oder weniger) Eisessig.

Gibt gute Kern- und Gewebsstrukturen und schwärzt Fettbestandteile. Fixierdauer $\frac{1}{2}$ —24 Stunden und länger. Gründlich auswässern und in Alkohol nachhärten! Für Hämatoxylinfärbung wenig geeignet, mehr für eine Anzahl Teerfarbstoffe (Safranin, Gentianaviolett) und Eisenhämatoxylin, nicht für *Romanowsky*-Färbung.

b) *Altmannsches* Gemisch. Gleiche Teile einer Kaliumbichromatlösung (5%ig) und Osmiumsäurelösung (2%ig).

Fixiert besonders die Granula sehr gut. Nachbehandlung und Färbung wie bei *Flemmings* Gemisch. Fixierdauer 24 Stunden.

c) *Hermannsches* Gemisch. 15 Teile Platinchloridlösung (1%ig), 4 Teile Osmiumsäurelösung (2%ig), 1 Teil Eisessig.

Fixiert Kerne und Plasma ausgezeichnet. Wird wie das *Flemmingsche* Gemisch angewendet, nur muß das Material noch gründlicher (3—12 Stunden in fließendem Wasser) gewässert werden. Färbung am besten mit Safranin oder Gentianaviolett.

d) *Borgertsches* Gemisch. 200 cm³ gesättigte Pikrinsäurelösung, 10 cm³ Platinchloridlösung (wässrige 10%ig), 2 cm³ Eisessig, 25 cm³ Osmiumsäurelösung (2%ig). Färbung mit Paracarmin oder *Heidenhains* Eisenhämatoxylin.

8. **Chromsäure** wird in wässriger oder alkoholischer Lösung von 0·1—1% angewendet. Sie hat sehr geringes Diffusionsvermögen und daher nimmt das Durchfixieren und ebenso das nachherige Auswaschen der Organstücke sehr viel Zeit in Anspruch. Die Differenzierung der Kerne ist nur mäßig. Die gesamte Prozedur des Fixierens und Auswaschens muß gut vor Licht geschützt vorgenommen werden, da sonst im Präparat unlösliche, sehr störend wirkende Niederschläge entstehen. Auch die chromsauren Salze haben diese Nachteile z. B. in der

a) *Müllerschen* Flüssigkeit, einer Lösung von 2·5 g Kaliumbichromat und 1·0 g Natriumsulfat in 100 cm³ dest. Wasser.

Sehr brauchbar und vielbenutzt sind dagegen Chromsäure und ihre Salze in Verbindung mit anderen Fixiermitteln. Aus solchen Mischungen besteht z. B.

b) das *Zenkersche* Gemisch (s. unter Sublimat),

c) das *Flemmingsche* Gemisch (s. unter Osmiumsäure),

d) die *Braßsche* Lösung (für Amöbenfixierung). 1 Teil Chromsäure, 1 Teil Eisessig, 1 Teil Platinchlorid, 400—1000 Teile Wasser.

e) Kaliumbichromatessigsäure nach *Tellyesniczky*. 3·0 g Kaliumbichromat, 5 cm³ Essigsäure, 100 cm³ dest. Wasser.

Kleine Objekte werden darin 1—2 Tage fixiert, gut ausgewaschen und durch die Alkoholreihe von 15% an durchgeführt.

9. **Pikrinsäure** fixiert in konzentrierter wässriger Lösung (1:160) besonders Kernfiguren recht gut, ruft aber in der übrigen Zelle leicht Macerationsercheinungen hervor, namentlich wenn die Lösung verdünnt ist. Aus dem gleichen Grunde darf nicht mit Wasser, sondern nur mit Alkohol nachgewaschen werden, und falls mit diesem nicht länger nachgehärtet wurde, entweder nur mit alkoholhaltigen Farblösungen (Boraxcarmin, Paracarmin) oder mit solchen rein

wässerigen tingiert werden, welche selbst fixierend wirken, wie Carmalaun, Häkalaun (*Mayer*) u. a.

Eine Eigenschaft hat die Pikrinsäure den meisten anderen Fixiermitteln voraus, das ist ihr großes Permeationsvermögen, welches namentlich bei der Darstellung solcher Zellen von Bedeutung ist, die von Chitinmembranen (Cysten u. s. w.) umgeben sind. Bei derartigen Objekten wird sie deshalb auch am meisten verwendet, u. zw. in der Regel in Form von Pikrinsäuregemischen, z. B. als

a) Pikrinessigsäure nach *Boveri*. 100 Teile konzentrierte wässrige Pikrinsäurelösung, 200 Teile Wasser, 3 cm^3 Eisessig.

b) Pikrinschwefelsäurenach *Doflein*. 1 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure, 100 cm^3 Pikrinsäurelösung konzentriert wässrig (besonders für Myxosporidien empfohlen).

Bisweilen wird die fixierende Eigenschaft der Pikrinsäure in sehr zweckmäßiger Weise mit ihrer färbenden verbunden, z. B. bei der von *Blochmann* modifizierten

c) *van Giesonschen Färbung* (s. S. 373).

10. **Benzoylsuperoxyd.** Ein neues Fixiermittel, durch welches die Präparate besonders gut für die *Romanowsky*-Färbung vorbereitet werden sollen, ist nach *Szécsi* das Benzoylsuperoxyd (Lucidol) in acetonischer und pyridinischer Lösung (50 g Lucidol in 500 cm^3 Aceton oder 30 g Lucidol in 250 cm^3 Pyridin). Das Mittel soll die Granulationen besonders gut konservieren, ferner osmiumfixierte Präparate vorzüglich bleichen und hierdurch auch Material, welches in *Hermannscher* oder *Flemmingscher* Flüssigkeit (s. S. 5 und 6) gehärtet wurde, *Romanowsky*-Färbung zugänglich machen. Bezüglich der Vorschriften zur Härtung und Färbung parasitologischen Materials sei auf die Originalarbeit verwiesen. Eine dort in Aussicht gestellte ausführliche Mitteilung mit Bildern steht zurzeit noch aus.

II. Verwendungsformen von Material.

(Schnitte, Feuchtpräparate, Trockenpräparate.)

A. **Schnitte** (Zelloidin, Paraffin, Gefrierschnitte) werden überall dort verwendet, wo es sich um das Studium der Verteilung der Protozoen innerhalb des befallenen Individuums bzw. um die Erforschung der durch die Parasiten hervorgerufenen Organveränderungen handelt. Ihre Anfertigung, Fixierung und Färbung geschieht genau nach den sonst in der histologischen Technik gegebenen Vorschriften und kann an dieser Stelle übergangen werden. Es sei daher hier nur auf die einschlägigen Werke, darunter insbesondere auf die von *Lee* u. *Mayer*, *Schmorl*, *Fischer*, *Heidenhain*, *Apathy* verwiesen.

B. **Feuchtpräparate** (Feuchtausstriche) werden hergestellt, indem man das Material (Blut, Gewebssaft, Reizserum), eventuell unter Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung, auf Objektträger bzw.

Deckgläschen austreibt oder entsprechende Organ- oder Kulturklatschpräparate anfertigt und das noch feuchte Material fixiert. Darauf wird gewässert, gefärbt und weiterhin genau so verfahren wie bei Schnitten, so daß die Präparate unter Vermeidung jeder Austrocknung in Öl bzw. flüssiges Paraffin übergeführt werden. (Wegen Behandlung entsprechender *Romanowsky*-Präparate s. S. 371).

C. Trockenpräparate (Trockenausstriche). Man bringt das Material, wie bei *B* beschrieben, auf Objektträger oder Deckgläschen, läßt es gut lufttrocknen werden und fixiert es. Wenn die Konservierung bestimmter Zellelemente, namentlich die der Kernstrukturen bei dieser Methode auch nicht so gut ist wie bei der Feuchtmethode, so ist der Gesamthabitus der Parasiten, besonders wenn auf sehr dünne und schnell zum Eintrocknen gebrachte Ausstriche gesehen wird, in der Regel so vorzüglich erhalten, daß die Identifizierung der betreffenden Mikroorganismen ohne Schwierigkeiten gelingt. Mit Rücksicht hierauf und den Umstand, daß die Herstellung der Trockenausstriche viel kürzere Zeit als die der Feuchtpräparate in Anspruch nimmt, wird ihnen stets der Vorzug gegeben, wenn es sich um rasche Diagnosestellung handelt.

Eine besondere Technik erfordert die Herstellung der **Blutrockenausstriche**, welche infolge der in den letzten Jahren erfolgten Entdeckung mannigfacher Arten protozoischer Blut-schmarotzer heute eine bedeutsame Rolle spielen. Man unterscheidet die Methode des „dünnen Ausstriches“ und des „dicken Tropfens“.

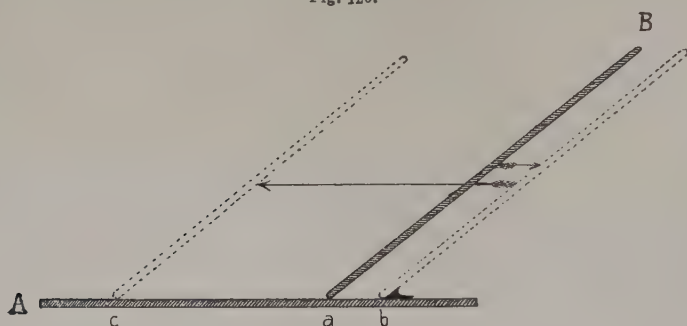
1. Der **dünne Ausstrich** wird am besten nicht auf Deckgläschen, sondern auf Objektträgern bereitet. Man verfährt hierbei folgendermaßen: In eine für die Blutentnahme besonders geeignete, mit Alkoholäther gut gereinigte Stelle (Fingerbeere, Ohr läppchen u. s. w.) wird eine Incision mittels eines Lanzettenschnepfers (sog. *Frankeschen* Nadel) oder einer Impffeder (*Heintze* und *Blanckerts*, Berlin) gemacht. Einen „kleinen“, frisch aus dem Einschnitt hervorquellenden Blutstropfen — den ersten wische man fort — bringt man durch Berührung mit einem fettfreien Objektträger *A* (s. Fig. 120) etwa auf dessen Stelle *b* und führt die schmale Kante eines zweiten geschliffenen Objektträgers *B* etwa von der Stelle *a* aus so weit an den Blutstropfen heran, bis dieser adhäriert und sich ziemlich über die ganze Kante hin verteilt. Darauf läßt man den Objektträger *B* in schräger Haltung langsam etwa bis *c* gleiten, wobei sich das Blut in sehr gleichmäßig dünner Schicht und ohne daß Blutkörperchen und Parasiten gequetscht werden, auf der ganzen Fläche des unteren Objektträgers ausbreitet. Durch schnelles Hin- und Herschwenken des letzteren in der Luft erzielt man ein fast augenblickliches Eintrocknen des Ausstriches. In guten Präparaten, die man bei einiger Übung stets erzielt, müssen die Blutkörperchen zum größten Teil einzeln nebeneinander liegen und dürfen keine auffallenden Schrumpfungs- oder Verzerrungserscheinungen (Stechapfelform u. dgl.)

zeigen. Die Konservierung der Parasiten ist dann gewöhnlich auch eine recht gute und reicht für diagnostische Zwecke in der Regel vollkommen aus.

2. Die andere Blutuntersuchungsmethode, die des **dicken Tropfens**, ist zuerst von *Ross-Ruge* für die Diagnose der Malaria angegeben worden.

Ross breitet einen „großen“ Blutstropfen auf dem Objektträger auf einer Fläche von etwa Markstückgröße aus, läßt antrocknen und legt dann das Präparat, ohne es zu fixieren, bis zur völligen Lösung des Hämoglobins (etwa $\frac{1}{4}$ Stunde) in eine wässrige 1%ige Eosinlösung. Hiernach wird vorsichtig mit Wasser abgespült und ohne zu fixieren, in einer alkalischen Methylenblaulösung, wie sie früher von *Nocht* zur *Romanowsky*-Färbung der Malariaparasiten benutzt wurde, gefärbt. *Ruge* hat das Ausziehen des Hämoglobins zugleich mit einer Fixierung verbunden. Er legt die lufttrockenen Präparate in eine $\frac{1}{2}$ —2%ige

Fig. 120.



wässrige Formalinlösung, der er $\frac{1}{2}$ —1%ige Essigsäure zusetzt. Hierauf färbt er nach *Manson* oder *Giemsa*. Andere Autoren lassen den Ausstrich nur gut antrocknen (am besten 1 Stunde und länger im Brutschrank bei 37°) und färben dann entweder ohne zu fixieren oder nach kurzer Alkoholhärtung (*Schilling*) nach *Giemsa*.

Der Vorteil des Dicktropfenverfahrens liegt darin, daß man in jedem Gesichtsfelde weit mehr Blutkörperchen als in dünnem Ausstrich beobachten kann, so daß dem Beobachter die Parasiten in nur schwach infiziertem Blut nicht so leicht entgehen. Die kaum gefärbten Stromata der Erythrocyten gewähren einem hierbei einen Durchblick durch die ganze Dicke des Präparates und die Parasiten heben sich im allgemeinen gut ab, wenn auch die Erhaltung ihrer Form manches zu wünschen übrig läßt.

III. Aufbewahrung ungefärbter und gefärbter Ausstriche.

Ausstriche, die nicht sofort, sondern erst nach längerer Zeit gefärbt werden sollen, hüllt man, nachdem sie lufttrocken geworden sind, in Fließpapier ein und bewahrt sie in sehr gut schließenden

Zylindern über wasserentziehenden Substanzen (Chlorcalcium, gebrannter Kalk) auf. Diese näht man am besten — um eine Verstäubung zu verhüten — in dichte Leinenbeutel ein und hüllt diese wieder in Watte. Während die Färbbarkeit der Präparate sonst, besonders in feuchtem Klima, sehr bald nachläßt, wird sie bei dieser Art der Aufbewahrung viele Jahre hindurch erhalten. Dies bezieht sich insbesondere auf die Darstellbarkeit der Kerne und der lokomotorischen Organe durch die *Romanowsky*-Färbung. Auch bereits gefärbte, vom Öle befreite und vor Licht genügend geschützte Ausstrichpräparate behalten in solchen Trockenbehältern ihre Farben viel länger als sonst.

IV. Färbevorschriften.

A. Singuläre Färbung.

Für die Färbung mit den einfachen acidochromen (sauren) oder basochromen (basischen) Anilinfarbstoffen und für die Herstellung der dazu benutzten Farblösungen gelten dieselben Vorschriften, die für die färberische Darstellung der Bakterien in Gebrauch sind und an einer anderen Stelle dieses Handbuches bereits eingehend beschrieben sind und hier deshalb übergangen werden können.

B. Panoptische (polychromatische) Simultan- und Sukzessivfärbung sowie Beizenfärbungen.

1. *May-Grünwald*-Färbung.

Bei dieser wird, ähnlich wie bei der bereits früher von *Jenner* angegebenen Färbemethode eine konzentrierte methylalkoholische Lösung von eosinsaurem Methylenblau angewendet.

Die frischen, unfixierten, lufttrockenen Deckglasausstriche werden in die in weitem, gut verschließbarem Standglas befindliche Lösung 2 Minuten bis 24 Stunden hineingestellt und dann mit destilliertem Wasser, dem einige Tropfen der Farblösung zugesetzt werden, abgespült.

Modifikation nach *Aßmann*.

Man übergießt das unfixierte Objektträgerpräparat in einer Petrischale mit 40 Tropfen Farblösung, läßt diese 3 Minuten einwirken, setzt dann 20 cm³ destilliertes Wasser, dem 5 Tropfen einer 1%igen Kaliumcarbonatlösung zugesetzt wurden, hinzu, vermischt Wasser und Farblösung innig miteinander, läßt 5 Minuten in dem Gemisch, nimmt heraus und trocknet ohne weitere Abspülung. Eine ähnliche Behandlung ist vom Autor für die Färbung von Gewebsschnitten angegeben.

Protozoenkerne färben sich nach dieser Methode dunkelblau, Protoplasma hellblau, neutrophile Granulationen bräunlichblau, Erythrocyten blaßrosa, eosine Zellen eosinfarben.

Um einen *Romanowsky*-Effekt zu erzielen (s. weiter unten), hat *May* (1906) eine Nachfärbung der nach *May-Grünwald* vorgefärbten

Präparate mit einer 0·5%igen Methylenazurlösung empfohlen. Sicherere Resultate erzielt man jedoch in dieser Beziehung, wenn man anstatt dessen die nachstehend beschriebene *Giemsa*-Färbung nachfolgen läßt.

2. *Giemsa*-Färbung.

Die ursprünglich von *Romanowsky*, u. zw. zur Darstellung der Malariaparasiten angegebene, aber sehr unsichere Methode hat nach ihrer späteren Vervollkommnung durch *Nocht*, *Ziemann*, *Ruge*, *Leishman*, *L. Michaelis* und namentlich durch *Giemsa* (Näheres hierüber siehe bei *Nocht*) für die gesamte Mikrobiologie große Bedeutung erlangt. Den Erfolg hat sie der außerordentlich kontrastreichen Wirkung zu verdanken, welche sie auf jedes Zellmaterial, sei es tierischer oder pflanzlicher Herkunft, ausübt. Bei Trockenpräparaten erscheinen die Kerne leuchtend rotviolett, das Plasma blau, andere Elemente präsentieren sich in Mischfarben von Blau und Rot mit sehr distinkter, teilweise durch Metachromasie hervorgerufener Abtönung; stark acidophile Einschlüsse erscheinen eosinfarben. Auch die Färbungsintensität und Differenzierung der Chromatin- und Chromidialsubstanzen sowie vieler Granulationen erreicht bei keinem anderen Tinktionsverfahren einen derartig hohen Grad wie bei der vervollkommenen *Romanowsky*-Färbung.

Nötige Farb-Stammlösung: *Giemsa*s Lösung für die *Romanowsky*-Färbung (fertig von Dr. K. *Hollborn*, Inhaber von Dr. *Grüblers* Laboratorium, Leipzig, Kronprinzstraße 71 zu beziehen).

Zusammensetzung: Azur II-Eosin 3·0 g, Azur II 0·8 g, Glycerin 125·0 g, Methylalkohol 375·0 g.

Allgemeine Regeln, die bei dieser Färbung zu beobachten sind: Das zu benutzende destillierte Wasser muß absolut sauber und säurefrei sein, ein sehr geringer Alkaleszenzgrad kann dagegen oft von Vorteil* sein. Man prüft das Wasser mit Hilfe einer frisch bereiteten Lösung von einigen Körnchen Hämatoxylin in etwas absolutem Alkohol. 10 cm³ des zu prüfenden Wassers mit einigen Tropfen dieser Lösung vermischt, sollen sich innerhalb 5 Minuten, nicht aber vor Ablauf einer Minute, schwach aber deutlich violett färben. Bleibt das Wasser farblos, so ist zum Vorratsgefäß so lange tropfenweise 1%ige Natriumcarbonatlösung zuzusetzen, bis in einer neuen Probe die erwähnte Reaktion innerhalb der angegebenen Zeit erfolgt. Sauber aufgefangesenes Regen- und Schneeschmelzwasser eignet sich, wenn es

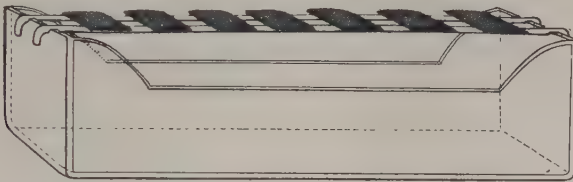
* Für die Darstellung mancher Gebilde, z. B. der Granula in den Eulenhalteridien (*M. Mayer*), der Perniciosaflecken und Halbmondkapseln (*Maurer*) bei der *Malaria tropica* ist sogar ein etwas stärkeres Alkalisieren empfehlenswert. In solchen Spezialitäten setzt man zu 10 cm³ des für allgemeine Zwecke brauchbar befundenen Wassers noch einen Tropfen einer 1%igen Natriumcarbonatlösung, bevor man den Farbstoff hinzufügt.

filtriert und — um die Kohlensäure aus ihm zu entfernen — abgekocht worden ist, gleichfalls zur Färbung; Leitungswasser dagegen nur selten; ein gewisser Gehalt desselben an anorganischen Salzen, namentlich an denen des Magnesiums, kann die Färbung völlig vereiteln.

Die Farblösung muß nach dem Verdünnen mit Wasser (10 Tropfen, aber nicht mehr, auf 10 cm³ dest. Wasser) „unverzüglich“ auf das vorher bereitgelegte Präparat gegossen werden.

Zum Verdünnen der Farblösung benutze man nur weite graduierte Glaszylinder (ca. 2½ cm Durchmesser), dagegen keine engen Reagensgläser. Man träufle die Lösung schnell in das Wasser, schwenke hierbei den Zylinder um, aber nur so lange, bis eine homogene Durchmischung beider Flüssigkeiten erfolgt ist. Schüttelt man zu lange, so läuft man Gefahr, daß sich das Farbsalz, welches aus der stark übersättigten wässerigen Lösung in normaler Weise erst nach Ausübung der Wirkung ausfallen soll, zum Nachteil der Färbung zu früh ausscheidet.

Fig. 121.



Man färbt auf zwei parallel über einer Glaswanne liegenden Glasstäben, deren Lage dadurch fixiert wird, daß man die Stabenden in einen weiten, mitten durchschnittenen Korken hineinsteckt, oder im Färbetrog nach *M. Mayer* (s. Fig 121 bei *Lautenschläger*, Berlin, zu haben) bei horizontaler Lage der Objektträger.

Bei der Herstellung von Feuchtpräparaten und Schnitten (Sublimatfixierung) dürfen keine Pinzetten aus Metall, sondern nur solche aus Horn u. s. w. benutzt werden.

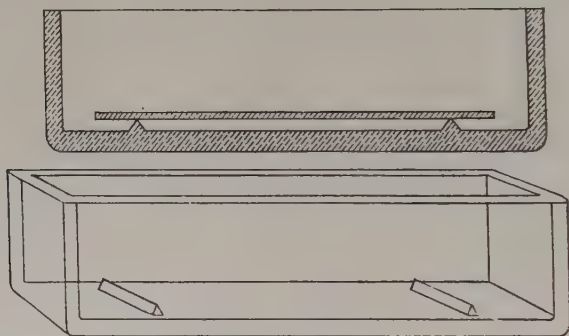
a) Gewöhnliche Methode (für Trockenausstriche).

Härtung der lufttrockenen Ausstriche in Alcohol absolutus 30 Minuten und länger, oder schneller (2—3 Minuten) in Methylalkohol. Aceton oder Alcohol abs. + Äther aa. Abtupfen mit Fließpapier. Übergießen der Präparate mit frisch verdünnter *Giemsa*-Lösung (10 Tropfen auf 10 cm³ Wasser). Mindestens 30 Minuten färben. Abwaschen im dünnen scharfen Wasserstrahl. Differenzieren in reinem Aceton, destilliertem oder ganz schwach mit Essigsäure versetztem Wasser (1 Tropfen Essigsäure auf 1 l Wasser) meist nur nach sehr langer Färbung nötig. Abtupfen, trocknen, einbetten in Paraffin liquid, oder *Hollborns*chen Neutralbalsam.

b) Schnellfärbmethode (für Trockenausstriche).

Die ursprünglich von *Giemsa* angegebene Methode (Erhitzungsmethode) ist in letzter Zeit von demselben Autor durch eine neue ersetzt worden. Hierzu braucht man neben der auf S. 368 erwähnten Farbstammlösung eine zweite sog. Farbfixierlösung, bestehend aus Azur II-Eosin 6 g und Azur II 0.6 g, gelöst in Methylalkohol 950 g und Glycerin 50 g. Färbung: Einlegen des lufttrockenen, unfixierten, sehr dünnen Objektträgersausstriches (Schichtseite nach oben) in einen trockenen Färbetrog (Fig. 122), (bei *Karl Zeiß*, Jena und *Lautenschläger*, Berlin, zu haben). Aus dem Tropffläschchen so viel Farbfixierlösung auf das Präparat träufeln, bis die Schicht hiermit völlig benetzt ist (ca. 12 Tropfen). Überlaufen über den Objektträger-

Fig. 122.

Färbetrog nach *Giemsa*.

rand ist zu vermeiden. Eine Minute bei bedeckter Schale einwirken lassen. Darauf in breitem Mischzylinder etwa 10 cm³ frisches Farbgemisch (10 cm³ dest. Wasser + 10 Tropfen gewöhnliche *Giemsa*-Lösung* in die Wanne gießen, so daß der ganze Objektträger in die Flüssigkeit eintaucht. Lebhaftes Hin- und Herschwanken, bis die beiden Farbflüssigkeiten völlig homogen durchmischt sind. 10 Minuten oder länger einwirken lassen, Farblösung abgießen, abspülen, trocknen, einbetten in Paraffin liquid. oder Neutralbalsam (vgl. *Giemsa*, 1914).

Modifikation nach *Rocha-Lima* (unveröffentlicht) zwecks schneller Untersuchung unfixierter Präparate während des Färbeprozesses.

Auf die frischen, trockenen, unfixierten, dünnen Objektträgersausstriche gießt man die in üblicher Weise verdünnte *Giemsa*-Lösung. läßt nach einiger Zeit auf diese ein Deckglas fallen und untersucht bald darauf bei mittlerer, nachher bei starker Vergrößerung (*Zeiß*, Objekt C).

* Im Notfalle kann man hierzu auch die in gleicher Weise verdünnte „Farbfixierlösung“ benutzen, nur fällt hierbei die Färbung meist etwas schwächer aus.

Zu dieser Methode ist folgendes zu bemerken:

Die Zeit vom Aufgießen der Farblösung bis zum Auflegen des Deckglases steigt mit dem Zell- und besonders Kernreichtum des zu färbenden Materials. Für dünne Ausstriche von Blut und von nicht sehr trüben Flüssigkeiten genügen 1—2 Minuten. Bei sehr zellreichen Ausstrichen empfiehlt es sich, die Farblösung nach 3—10 Minuten— wegen der dann normalerweise entstehenden Niederschläge — durch aufgegossene frische zu verdrängen und in dieser zu untersuchen. Unmittelbar vor Auflegen des Deckglases läßt man bei größeren Mengen der Farblösung zunächst den größten Teil derselben durch Schräghalten des Objektträgers abfließen. Es bleibt dann stets noch eine zur Vollendung der typischen Färbung genügende Menge Farblösung zurück. Hat man durch die bei schwacher Vergrößerung vorgenommene Untersuchung eine besonders brauchbare Stelle im Präparat festgestellt und will man bei stärkerer Vergrößerung untersuchen, so fixiert man vorher das Deckglas auf dem Objektträger. Man erreicht dies leicht dadurch, daß man Fließpapierstreifen an zwei entgegengesetzten Seiten des Deckgläschens anbringt und auf diese Weise die überschüssige Farblösung absaugt, so daß das Deckglas durch Capillarität festgehalten wird.

Auch andere Farbstofflösungen, wie Hämalan, Eisenhämatoxylin, Methylgrün-Pyronin u. s. w. liefern, in analoger Weise verwendet, sehr brauchbare Färbungen.

c) Feuchtpreparate (Feuchtausstriche).

Fixieren der sehr dünnen, noch feuchten Ausstriche in auf 60—70° erwärmten Sublimatalkohol nach *Schaudinn* (s. S. 360) 1—24 Stunden und beliebig länger, hierbei Objektträger (Deckgläschen) mit nach unten gekehrter Schichtseite auf Lösung werfen, nachher umdrehen (Die Lösung braucht nur beim Einlegen der Objekte warm zu sein).

Abwaschen in Wasser oder 70%igem Alkohol.

10 Minuten lang in eine Lösung von Jodkali 2 g in dest. Wasser 100 g, welcher 3 cm³ *Lugolscher* Lösung zugefügt wurden, oder — für die Erhaltung des Plasmas (Granulationen) vorteilhafter — in sehr verdünnte Jodtinktur (1 cm³ Tinktur auf 100 cm³ Alkohol 60%ig). Abwaschen in Wasser.

10 Minuten lang in eine 0.2—0.5%ige wässrige Lösung von Natriumthiosulfat. Gut abwaschen in Wasser.

Färben mit frisch verdünnter *Giemsa*-Lösung (nach der ersten halben Stunde alte Lösung ab- und frische darauf gießen). Abspülen in Wasser und hindurchführen durch folgende Reihe: 1. Aceton 95 cm³. Xylol 5 cm³; 2. Aceton 70 cm³, Xylol 30 cm³; 3. Aceton 50 cm³, Xylol 50 cm³; 4. Xylol pur.

Anstatt 1 kann auch reines Aceton benutzt werden. Die Präparate dürfen, nachdem sie einmal jodiert bzw. de-

jodiert worden sind, nicht noch längere Zeit in irgendwelchen Medien aufbewahrt werden, sondern müssen bald gefärbt werden, weil sie sonst sehr bald ihre spezifische Färbbarkeit einbüßen. Dies bezieht sich ebenso auf Schnitte.

d) Schnitte. Organstücke, nicht über 5 mm dick, werden in Sublimatalkohol oder wässriger Sublimatlösung 48 Stunden oder beliebig länger fixiert. Die sehr dünnen Paraffinschnitte kommen aus Wasser (oder 70%igem Alkohol) wie Feuchtpräparate 10 Minuten lang in eine der unter c angegebenen Jodlösungen und werden auch weiterhin genau wie die Feuchtpräparate behandelt.

Eine Vereinfachung der Methode kann man nach *Rocha-Lima* erzielen, indem man den aus der *Giemsa*-Lösung kommenden Schnitt in einer alkoholischen Eosinlösung (5 cm³ 1%iger wässriger Lösung von Eosin BA + 100 cm³ 96%igen Alkohol) differenziert und ihn darauf durch Alcohol absolutus, Xylol, in Balsam bringt. Die Länge der Differenzierung ist sehr variabel und wird am besten ausprobiert. Die Methode, die auch für alkohol- oder formalingehärtetes Material verwendbar ist, gibt stets eine sehr distinkte, besonders für die Untersuchung von Entzündungszellen wertvolle Doppelfärbung, wenn auch anstatt der typisch roten Kernfarbe des *Romanowsky*-Bildes bisweilen eine mehr oder weniger blaue erzielt wird (Methode ist nicht veröffentlicht).

3. Löfflersche Geißelfärbung.

Beize: 20%ige, heiß bereitete Lösung von Tamin 100 cm³, kalt gesättigte Lösung von Ferrosulfat (oder Eisenammoniumoxydsulfat) 50 cm³, alkoholische (oder wässrige) Fuchsinlösung (auch solche von Methylviolett oder Wollschwarz) 10 cm³, werden miteinander gemischt. Farblösung: Anilinwasser-Fuchsin-Lösung (jedesmal frisch zu bereiten).

Beizung und Färbung: Man behandelt den Ausstrich $\frac{1}{2}$ —1 Minute lang mit der Beize (die am besten fertig von Dr. *Hollborn*, Leipzig, bezogen wird) unter leichtem Erwärmen über der Spiritusflamme, spült gründlich mit Wasser ab und färbt 1—2 Minuten, wiederum unter leichtem Erwärmen in der Farblösung, der man vorher so viel einer $\frac{1}{10}$ %igen Natronlauge hinzugesetzt hat, bis eine schwache (beim Erwärmen verschwindende!) Schwebefällung entstanden ist. Abspülen in Wasser, trocknen, Balsam.

4. Mansonsche Färbung.

Farb-Stammlösung: In 10 cm³ kochenden Wassers werden zunächst 5.0 g Borax und darauf 2.0 g Methylenblau (med. Höchst) gelöst. Die Lösung wird im Reagensglas so stark verdünnt, bis sie soeben anfängt

durchscheinend zu werden. Man färbt 10—15 Sek. Die Methode wird vornehmlich für die Schnelldiagnose bei Malaria verwendet. Die Kernfärbung erfolgt bei diesem Verfahren in erster Linie durch das aus dem Methylenblau infolge der Alkaliwirkung entstandene Methylenazur (vgl. weiter unten). Wegen immer weiter fortschreitender Farbstoffzersetzung von unerwünschter Art ist die Lösung nur kurze Zeit haltbar.

5. Färbung mit Azur II.

Lösung I: 1 g Azur II (Azur II = Mischung von gleichen Teilen Methylenazur und Methylenblau) in 100 cm³ 1/2%igem Carbolwasser (jahrelang haltbar).

Lösung II: 1 g krystallisiertes Natriumcarbonat (oder Natriumhydroxyd) in 100 cm³ destilliertem Wasser.

Man verdünnt kurz vor der Färbung einige Tropfen von Lösung I mit destilliertem Wasser wie bei der *Manson*-Färbung, gibt zu 10 cm³ der Verdünnung 1—10 Tropfen von Lösung II (bei Natriumhydroxyd nicht mehr als 2 Tropfen) und färbt 10—15 Sekunden oder länger. Durch dieses Verfahren läßt sich die *Mansonsche Färbemethode* und eine ganze Reihe anderer namentlich in der Bakteriologie gebräuchlichen Vorschriften ersetzen, bei denen alkaliversetzte Methylenblaulösungen benutzt werden (*Löfflersche Lösung*, *Kochsche Lösung*), die alle bezüglich Haltbarkeit und dauernd gleichmäßiger Wirkung zu wünschen übrig lassen.

6. Blochmannsche Färbung (modifizierte *van Gieson*-Färbung).

Farblösung: in 100 cm³ gesättigter Pikrinsäurelösung wird 0.01 g phenylrosanilintrisulfosaures Natrium gelöst.

Färbung: Schnitte bleiben bis zu 12 Stunden in der Lösung. Wird besonders für Myxosporidiensporen empfohlen. Schale der Sporen gelb, Sporoplasma und Polkapseln grün, Kernfärbung rot.

7. Mallorysche Färbung.

Nötige Lösungen (wässrig): 1. Säurefuchsinlösung, 1‰; 2. Phosphormolybdänsäurelösung, 1‰; 3. Anilinblau, 0.5‰; 4. Orange G, 2‰; 5. Oxalsäure, 2‰.

Fixierung: Sublimat oder *Zenkersche Flüssigkeit*.

Färbung: Zelloidin- oder Paraffinschnitte kommen aus Wasser 1—3 Minuten in Lösung 1, dann nach Auswaschen in Wasser 1 Minute und länger in Lösung 2 (Platin- oder Glasnadel!). Gut auswaschen mit Wasser, schließlich 5 Minuten lang in eine Mischung aus gleichen Teilen von Lösung 3, 4, 5. Rasches Abspülen in Wasser, direkt in Alkohol 96%ig, Alcohol absolutus, Xylolbalsam.

Besonders für Myxosporidiensporen empfohlen.

8. Triacidfärbung nach Ehrlich.

Farblösung: Eine Lösung von Methylgrün, Orange G und Säurefuchsin.

Färbung: Präparate 30—45 Sekunden bei 120° fixieren. 5 Minuten lang Farbstoff einwirken lassen, gründliches Abspülen in Wasser, bis keine Farbe mehr abgeht. Trocknen zwischen Fließpapier, Balsam. Für Bluttrockenausstriche empfohlen.

9. Methylgrün-Pyronin-Färbung nach Unna-Pappenheim.

Farblösung: Methylengrün 00 kryst. gelblich 0.15 g, Pyronin 0.25 g, Alkohol 2.5 g, Glycerin 20.0 g, 0.5%iges Carbolwasser 100.0 g.

Färbung: 1. Zelloidin-, Paraffin- oder Gefrierschnitte (Härtung nur in Alcohol absolutus) aus Wasser 20—40 Minuten in Farblösung erwärmen, dann Lösung schnell abkühlen, 2. abspülen in Wasser 1—3 Minuten, 3. rasch in Alcohol absolutus entwässern, 4. Bergamottöl oder Xylolbalsam.

10. Borrel'sches Gemisch.

Farblösung 1: Konzentrierte wässrige Lösung von Magentarot: Farblösung 2: Konzentrierte wässrige Lösung von Pikrinsäure: Farblösung 3: Wässrige Indigocarminlösung.

Färbung: Formol- oder sublimatgehärtete Schnitte kommen erst in Nr. 1, dann in ein Gemisch von gleichen Teilen 2 + 3.

11. Hämatoxylinfärbungen.

Hämatoxylin färbt selbst nicht, sondern nur einige seiner niederen Oxydationsprodukte, insbesondere das Hämatein. Frisch bereitete Hämatoxylinlösungen müssen daher, gleichviel ob sie wässrig oder alkoholisch sind, vor dem Gebrauch erst einige Tage, am besten im offenen Gefäß, beiseite gestellt werden, damit sich durch Einwirkung des Luftsauerstoffes diese Oxydationsprodukte in genügender Menge bilden können.

Die Färbung mit derartig vorbereiteten Hämatoxylinlösungen gelingt nach fast allen Fixierungsmethoden. (Nach der Behandlung mit Chromosmiumgemischen geht sie etwas langsam von statten und muß daher auf längere Zeit ausgedehnt werden.) Jedesmalige Filtration der Lösung vor der Färbung ist angezeigt. Nach der Färbung wird eine halbe bis mehrere Stunden in Leitungswasser gewaschen. Die Färbung ist monochromatisch: Kerne tiefblau, Protoplasma, Schleim u. s. w. blaßblau.

Differenzierungs- (Entfärbungs-) Mittel: 1. Salzsäurealkohol (ein Teil konzentrierte Salzsäure auf 100 Teile 70%igen

Alkohol) eine Minute oder 2. Alaunlösung (0.5%ig). Diese wirkt langsamer und gestattet daher eine bessere Verfolgung des Differenzierungsgrades. Nach beiden Mitteln eine halbe Stunde in öfter zu wechselndes oder am besten fließendes Leitungswasser. Folgende Hämatoxylinlösungen werden bei der Protozoenforschung bevorzugt:

a) *Hämatoxylin nach Böhmer*. Lösung I: 1 g krystallisiertes Hämatoxylin in 10 cm³ Alcohol absolutus; Lösung II: 20 g Alaun in 200 cm³ warmem dest. Wasser. Man läßt erkalten und filtriert.

Nach 24stündigem Stehen werden beide Lösungen gemischt. Das Gemisch bleibt 8 Tage in weithalsigem Gefäß offen stehen und wird darauf filtriert.

b) *Hämatoxylin nach Delafield (Grenacher)*. 400 cm³ Ammoniakalaunlösung (wässerig konzentriert) werden mit 40 g krystallisiertem Hämatoxylin, das in 25 cm³ Alcohol absolutus gelöst ist, gut gemischt. Das Gemisch bleibt 3—4 Tage in offenem Gefäß stehen, wird dann filtriert und nach Zusatz von je 100 cm³ Methylalkohol und Glycerin in geschlossener Flasche aufbewahrt. Ältere Lösungen, die sehr leicht überfärben, verdünnt man vor dem Gebrauch mit 2%iger Alaunlösung.

c) *Hämalaun nach P. Mayer*. Lösung I: Hämatein 1.0 g in Alcohol (90%ig) 50 cm³. Lösung II: Kalialaun 50.0 g in dest. Wasser 1000 cm³. Man gießt I und II zusammen, läßt erkalten, absetzen und filtriert. Die Lösung ist sofort gebrauchsfähig, da sie das für die Färbung nötige Oxydationsprodukt des Hämatoxylins bereits von vornherein enthält.

d) *Saures Hämalaun* erhält man, indem man zum Hämalaun nach Mayer 2% Eisessig hinzufügt.

e) *Saures Hämatoxylin nach Ehrlich* besteht aus: Wasser 100 cm³, Alcohol 100 cm³, Glycerin 100 cm³, Eisessig 10 cm³, Hämatoxylin 2.0 g, Alaun im Überschuß. Lösung, die sehr haltbar ist, muß reifen bis sie gesättigt rot erscheint.

f) *Eisenhämatoxylinfärbung nach Heidenhain*. Lösung I: 2½%ige wässrige Lösung von violetter Eisenammoniumoxydsulfat; Lösung II: Hämatoxylin 1.0 g, Alcohol absolutus 10 cm³, dest. Wasser 90 cm³; Lösung II, die mindestens 4 Wochen reifen muß, wird am besten fertig bezogen.

Man fixiert vorteilhaft in Sublimatgemischen oder im *Flemming*-schen Gemisch (s. S. 362), beizt die sehr dünnen, von Paraffin befreiten Schnitte ½—3 Stunden und wäscht mit destilliertem Wasser gut aus, hierauf färbt man 24—36 Stunden in Lösung II, wäscht in reichlichem Leitungswasser aus und differenziert in Lösung I unter steter Kontrolle durch das Mikroskop, bis das Plasma ganz hell ist und die Kerne ein schwarzes Chromatingerüst zur Schau tragen, spült gründlich in Leitungswasser ab und bringt das Präparat durch Alkoholreihe, Xylol, in Kanadabalsam.

Das *Heidenhainsche* Verfahren, welches sich insbesondere zur Darstellung der Centrosomen vorzüglich eignet, aber sehr lange Zeit erfordert, ist neuerdings von *Breidl* und *Rosenbusch* modifiziert und sehr abgekürzt worden. Auch bei diesen Methoden, die hauptsächlich der Herstellung von Feuchtausstrichen dienen, werden ausgezeichnete Bilder erhalten. Am schnellsten führt das Verfahren von *Rosenbusch* zum Ziel.

g) *Eisenhämatoxylinfärbung* nach *Rosenbusch*. Lösung I: Eisenammoniumoxydsulfat $3\frac{1}{2}$ —5%ig, wässrig. Stammlösung II: Hämatoxylin 1·0 g, Alkohol (96%ig) 100 cm³ (reifen lassen!). Stammlösung III: Gesättigte wässrige Lösung von Lithiumcarbonat.

Man fixiert in Sublimataalkohol nach *Schaudinn* (s. S. 360), spült in 50%igem Alkohol ab und führt in Wasser über. (Jodalkohol kann nach *Rosenbusch* ausgeschlossen werden, wenn die Fixierungsflüssigkeit keine Sublimatkrystalle zeigt. Ist er benutzt worden, so muß nochmals mit Wasser gewaschen werden.) Hierauf beizt man 1½ Stunden in Lösung I, spült gut mit Wasser ab und färbt 5 Minuten oder weniger in einer frisch hergestellten Mischung von 10 cm³ der Lösung II plus so viel (5—6) Tropfen der Lösung III, bis die Hämatoxylinlösung weinrot aussieht. Bei Bedarf differenzieren in vorher noch stark zu verdünnender Lösung II (empfehlenswerter kürzeres Färben, ohne zu differenzieren), Wasser, Alkoholreihe, Xylol, Kanadabalsam.

Das *Breidlsche* Verfahren ist dem von *Rosenbusch* angegebenen sehr ähnlich, nur wird anstatt der alkoholischen Hämatoxylinlösungen eine 0·5%ige wässrige benutzt und eine halbe Stunde lang gefärbt.

12. Carminfärbungen.

a) *Alauncarmin* (*Grenacher*). Farblösung: 1·0 g Carmin wird mit 100 cm³ eines 5%igen Kali- oder Ammoniakalaun 20 Minuten gekocht und nach dem Erkalten filtriert.

Färbung gelingt am besten nach Fixierung in Alkohol. Sublimat, Formalin, *Müllerscher* Flüssigkeit. Schnitte aus destilliertem Wasser 10 Minuten bis mehrere Stunden in Farblösung legen, sehr gut in Wasser auswaschen, einlegen in Glycerin oder nach Alkoholreihe in Öl oder Balsam. Kerne violett, Protoplasma farblos. Überfärbung tritt auch bei tagelangem Belassen in der Farblösung nicht ein.

b) *Carmaalun* (*Mayer*). Man löst 1·0 g Carminsäure und 10·0 g Alaun in 200 cm³ Aq. dest., läßt absetzen, filtriert ab und setzt 1 cm³ Formol oder 0·2 g Salicylsäure zu. Die hiermit gefärbten Objekte werden mit Wasser, oder falls reine Kernfärbung gewünscht wird, vorher noch mit Alaunlösung behandelt. Im allgemeinen färbt Carmaalun wie Alauncarmin, hat aber größere Tiefenwirkung als dieses.

c) *Boraxcarmin* (*Grenacher*). Farblösung: Carmin 0·5 g, Borax 2·0 g, Aq. dest. 100 cm³, werden miteinander gemischt,

Mischung gekocht und ihr unter fortwährendem Umrühren tropfenweise 0·5%ige Eisessigsäure zugesetzt, bis die Lösung tiefrot gefärbt ist (etwa 4·5 cm^3). Nach 24 Stunden wird filtriert.

Färbung (Fixierung wie bei Alauncarmin). Schnitte mit destilliertem Wasser 3—20 Minuten in Farblösung, abspülen in Wasser, Differenzierung in Salzsäurealkohol (1 Teil Salzsäure auf 100 cm^3 Alkohol 70%ig). Gründlich auswaschen in Wasser, dann Alkoholreihe, Öl, Balsam.

Kerne rot mit meist sehr guter Struktur.

d) **Pikrocarmin** (nach *Neumann*). Farblösung: Man löst 0·5 g Pikrinsäure in 40 cm^3 des *Grenacherschen* Boraxcarmin.

Färbung: Alkoholgehärtete Schnitte in der Farblösung 5—10 Minuten färben, darauf 10 Minuten lang in Salzsäureglycerin (4 Tropfen Salzsäure auf 10 cm^3 Glycerin). Hierauf entweder in reinem Glycerin untersuchen oder in pikrinsäurehaltigem Alkohol entwässern, in Öl aufhellen und in Balsam. Kerne rot, Protoplasma gelb.

e) **Indigearmin** (nach *Mayer*). Lösung I: (Nur wenige Monate haltbar) 1·0 g Indigearmin wird in 500 g dest. Wasser oder 5%iger Alaunlösung gelöst. Lösung II: Carmalaun oder Häkalaun (siehe dieses). Ein Teil von Lösung I wird mit 4—20 Teilen von Lösung II vermischt und mit dieser Mischung gefärbt. Indigearmin in einfacher wässriger Lösung färbt nur diffus (*Mayer*).

V. Versilberung

in der Protozoologie hauptsächlich zur Darstellung der Spirochäten in Schnitten, besonders der *Spirochaeta pallida* gebraucht).

A. Levaditi-Methode (für Schnitte).

a) **Alte Vorschrift**: 1. Fixieren dünner Gewebsscheiben in 10%igem Formalin 24 Stunden und länger; 2. übertragen in 90%igen Alkohol auf 24 Stunden; 3. einlegen in destilliertes Wasser, bis Stücke untersinken; 4. einlegen auf 3—6 Tage in eine 1·5—3%ige wässrige Lösung von Silbernitrat bei 37°; 5. kurz abwaschen in destilliertem Wasser; 6. reduzieren 24—48 Stunden bei Zimmertemperatur in einer Mischung von 5 cm^3 (40%igem) Formalin + 100 cm^3 destilliertem Wasser, in der 2—4 g Pyrogallussäure gelöst sind; 7. auswaschen in Wasser, einbetten in Paraffin, schneiden (nur mittlere Schnitte brauchbar).

4—5 unter Lichtabschluß (dunkle Flasche) ausführen!

b) **Neue Vorschrift**: 1. Fixieren in 10%igem Formalin 24 Stunden; 2. nachhärten in 90%igem Alkohol 12—16 Stunden; 3. übertragen in destilliertes Wasser, bis Stücke untersinken; 4. einlegen (einhängen in 90 cm^3 einer 1·5%igen Silbernitratlösung, der unmittelbar vor dem Gebrauch 10 cm^3 reinstes Pyridin zugesetzt werden (dunkle Flasche!) zuerst 2—3 Stunden bei Zimmertemperatur, nachher 4—6 bei 50°;

5. rasch abwaschen in reinem Pyridin; 6. reduzieren 12 Stunden in folgender Lösung: Man mischt unmittelbar vor dem Gebrauch 90 cm^3 (4%ige) Pyrogallussäurelösung mit 10 cm^3 reinstem Aceton und setzt zu 85 cm^3 dieses Gemisches 15 cm^3 Pyridin (dunkle Flasche); 7. übertragen in Alkohol und rasch einbetten in Paraffin, schneiden. Von vielen Autoren wird die ältere Methode als die sicherere vorgezogen.

B. Methode nach Bertarelli und Volpino (für Schnitte).

1. Sehr dünne Schnitte aus Wasser auf 24—48 Stunden in 0·2 bis 0·5%ige Silbernitratlösung bringen; 2. auswaschen in destilliertem Wasser; 3. $\frac{1}{4}$ Stunde lang in *van Ermengers* Geißelbeize, bestehend aus einer Lösung von Acid. pyrogall. 5·0 g, Tannin 3·0 g, Natrium acet. fus. 10·0 g in Aq. dest. 350·0 g; 4. zurückbringen in Lösung I, bis die Schnitte bräunlichgelb geworden sind.

C. Methode nach Fontana (für Trockenausstriche).

Eine brauchbare Methode zur intensiven und raschen Färbung (Versilberung) des *Treponema pallidum* und anderer Spirochäten in Trockenausstrichen. Das mit einem Tropfen destillierten Wassers verdünnte Untersuchungsmaterial wird auf den Objektträger ausgebreitet und nach dem Lufttrocknen über der Flamme fixiert; dann werden einige Tropfen einer Lösung A (Gerbsäure 5·0 g, Aq. destill. 100·0 g) aufgegossen, die 30 Sekunden bis zur Entwicklung schwacher Dämpfe erwärmt und 30 Sekunden in fließendem Wasser abgespült wird. Darauf Aufgießen einiger Tropfen einer Lösung B (Silbernitrat 5·0 g, Aqua destill. 100·0 g, Ammoniak 9·0 g, letzteres tropfenweise zugesetzt), 20—30 Sekunden lang erwärmen über der Flamme, abspülen, abtupfen mit Fließpapier. Die Spirochäten erscheinen dann intensiv gelb oder braun gefärbt.

VI. Das Tuscheverfahren*.

Das Tuscheverfahren, ein von *Burri* angegebenes Negativverfahren, dient gleichfalls zur besseren Sichtbarmachung protozoischer Mikroorganismen.

Eine kleine Öse protozoenhaltiges Sekret u. s. w. wird mit Wasser verdünnt, hiervon eine Öse mit einem kleinen Tropfen chinesischer Tusche (Fabrikat Günther & Wagner, Hannover, auch bei Grübler erhältlich) verrührt, das Ganze zu einem dünnen bräunlichen Fleck verstrichen und darauf wird mit Ölimmersion untersucht. Hat die Schicht die richtige Dicke, so erscheinen die meisten corpusculären Elemente, darunter die Mikroorganismen, ungefärbt auf dem durch die sedimentierten Tuscheartikel bräunlichen Grunde. Die Methode, die später von anderen Autoren, so von *Hecht* und *Wilenko*, *Hoffmann*, *Frühwald*, *Gins*,

* Siehe auch den Artikel von *Busson*, S. 151.

verschiedentlich, aber unwesentlich abgeändert worden ist, wird besonders zum Auffinden von Spirochäten angewendet.

VII. Vitalfärbung.

Diese bezweckt die Färbung irgendwelcher Bestandteile der „lebenden“ Zelle.

Zu den Farbstoffen, welche sich hierzu besonders eignen, gehören Neutralrot (färbt saure Zellelemente distinkt kirschrot, alkalische gelbrot). Neutralviolett, Bismarckbraun, Brillantkresylblau, Methylenblau, Methylenazur, Nilblau (-Sulfat und -Chlorhydrat), Auramin, Malachitgrün, Alizarin, Orange, Tropäolin 00, Kongorot, Dimethylamidoazobenzol.

Man führt die Färbung derart aus, daß man die Farbstoffe in physiologischer Kochsalzlösung oder in Leitungswasser, welches allerdings meist alkalisch reagiert, auflöst und einen kleinen Tropfen der Lösung entweder direkt zum Deckglaspräparat setzt oder ihn auf dem Objektträger eintrocknen läßt und das Material auf den eingetrockneten Farbstoff bringt. Näheres s. unter *Giemsa* bzw. in der dort angegebenen Spezialliteratur von *Altmann*, *Fischer*, *Fischel*, *v. Prowazek*, *Ehrlich*, *Plato*, *Michaelis-Heidenhain*.

Als Nachschlagewerke, in denen die Färbung der verschiedenen Protozoengattungen bzw. -arten spezialistisch behandelt ist, seien unter anderm empfohlen: *Abel*, Bakteriologisches Taschenbuch. 23. Aufl., Würzburg 1920. — *Doflein*, Lehrbuch der Protozoenkunde, 4. Aufl., 1916. — *Hartmann-Schilling*, Die pathogenen Protozoen. Berlin 1917. — *Kißkalt* u. *Hartmann*, Praktikum der Bakteriologie und Protozoologie. 2. Aufl., Jena 1909 bis 1910. — *Kolle-Wassermann*, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 2. Aufl., Jena 1912. — *Mense*, Handbuch der Tropenkrankheiten. 2. Aufl., Leipzig (im Erscheinen). — *Neumann-Mayer*, Tierische Parasiten. München 1914. — *v. Prowazek*, Taschenbuch der mikroskopischen Technik der Protistenuntersuchung. 2. Aufl., Leipzig 1909, Neuaufgabe vom Verlag angekündigt; Handbuch der pathogenen Protozoen. Leipzig 1912, I; 1920, II; III im Erscheinen.

Literatur: *Abel*, Bakteriologisches Taschenbuch. 23. Aufl., Würzburg 1920. — *Altmann*, Die Elementarorganismen und ihre Beziehung zu den Zellen. 2. Aufl., Leipzig 1892. — *Apathy*, Die Mikrotechnik der tierischen Morphologie. Leipzig 1896. — *ßmann*, Münchner medizinische Wochenschrift 1906, Nr. 28, S. 1350. — *Bertarelli* u. *Volpino*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1905, **XL**, H. 1. — *Blochmann*, A. f. Protistenkunde 1905, **VI**. — *Böhmer*, A. f. mikrosk. Anat. 1868, **IV**, S. 345. — *Borgert*, Zool. Jahrb. 1900, **XIV**, S. 207. — *Boveri*, Zt. f. Naturw. **XXI**, Jena 1887. — *Braß*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1884, S. 39. — *Burri*, Das Tuscheverfahren. Jena 1909. — *DeLafield*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1885, **II**, S. 288. — *Dempwolff*, Blutuntersuchung auf Malaria im Tropfpräparat. A. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1908, **XII**, S. 435. — *Doflein*, Protozoenkunde. — *Ehrlich* P., Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Berlin 1885; Über die Methylenblaureaktion der lebenden Nervensubstanz. D. med. Woch. 1886; Über schmerzstillende Wirkungen des Methylenblau. D. med. Woch. 1890; Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes. (Ges. Mitt.) Berlin 1891; Vortrag über das Neutralrot im Verein für innere Medizin. Ref. M. med. Woch. 1894; Über die Beziehungen von chemischer Konstitution, Verteilung und pharmakologischer Wirkung. Vortrag. Festschrift für Leyden 1898, **I**.

— *Ehrlich* u. *Lazarus*, Normale und pathologische Histologie des Blutes. — *Fischel*, Untersuchungen über vitale Färbung. Anat. Hefte, I. Abt., 1901, H. 52/53; Färbungen. Aus Enzykl. d. mikrosk. Technik 1903, I. — *Fischer*, Fixierung, Färbung und Blau des Protoplasmas. Jena 1899. — *Flemming*, Zellsubstanz, Kern und Zellteilung. Leipzig 1882. — *Fontana*, Dermat. Woch. 1912, LV, S. 1003. — *Frühwald*, M. med. Woch. 1909, Nr. 49, S. 2523. — *Giemsa*, Färbemethoden für Malaria-Parasiten. Zbl. f. Bakt. 1902, XXXI, S. 429; Eine Vereinfachung und Vervollkommenung u. s. w. Ibid. 1904, XXXVII, S. 308; Über die Färbung von Feuchtpräparaten u. s. w. D. med. Woch. 1909, Nr. 40; Über die Färbung von Schnitten u. s. w. D. med. Woch. 1910, Nr. 12; Zur Färbung von Feuchtpräparaten und Schnitten u. s. w. Zbl. f. Bakt. LIV, 1910, S. 489; Über eine neue Schnelfärbung u. s. w. M. med. Woch. 1910, Nr. 47; Fixierung und Färbung der Protozoen in v. *Prowazek's* Handbuch der pathogenen Protozoen. I, Leipzig 1911; Zur Schnelfärbung (*Romanowsky-Färbung*) von Trockenaussstrichen. Zbl. f. Bakt. LXXIII, 1914; Paraffinöl als Einschlußmittel u. s. w. Zbl. f. Bakt. 1913, LXX, S. 444. — *Gins*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, LII, S. 620. — *Grenacher*, A. f. mikr. Anat. 1879, XVI, S. 465. — *Hartmann* u. *Kißkalt*, Praktikum der Bakteriologie und Protozoologie. 2. Aufl., Jena 1910. — *Hecht* u. *Wilenko*, Wr. kl. Woch. 1909, S. 932. — *Heidenhain*, Plasma und Zelle. Jena 1907; Über die Haltbarkeit mikroskopischer Präparate u. s. w. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1908, S. 397. — *Hermann*, A. f. mikrosk. Anat. 1889, XXXIV, S. 59. — *Hoffmann*, Monatsh. f. prakt. Dermat. 1909, S. 327. — *Jenner*, Lancet 1899, S. 370. — *Lee* u. *Mayer*, Grundzüge der mikroskopischen Technik. — *Levaditi*, J. d. Phys. et de Path. gén. 1901, Nr. 3; Ann. de l'Inst. Past. No. 1, 25/106, XX, S. 43; Compt. rend. Soc. de biol. 1906, LX, Nr. 3. — *Löffler*, Zbl. f. Bakt. 1889, VI, S. 209 u. 1890, VII, S. 629. — *Mallory*, J. exper. med. 1900, V; Ref. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1901, XVIII, S. 175. — *Mawer*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., XXVIII, S. 114 u. XXXII, S. 695. — *May*, M. med. Woch. 1906, Nr. 8, S. 358. — *May-Grünwald*, Zeitschrift für innere Medizin 1902, Nr. 11, S. 265. — *Mayer P.*, Sitzungsbericht der naturw. Ver. Lotos 1896. — *Mayer M.*, Über die Entwicklung von Halteridium. A. f. Schiffs- und Tropenhyg. 1910, XIV, S. 197. — *Mense*, Handbuch der Tropenhygiene. 2. Aufl., Leipzig 1913. — *Müller*, Verhandl. d. phys.-med. Ges. Würzburg 1859, X, S. 180. — *Neumann-Mayer*, Tierische Parasiten. München 1914. — *Nocht*, Zur Färbung der Malaria-Parasiten. Zbl. f. Bakt. 1899, XXV; Färbung von Blutparasiten in: Enzykl. d. mikrosk. Technik. — *Pappenheim*, Färbung der Plasmazellen. A. f. path. Anat., CLVII, S. 164 u. 166. — *Plato*, Berl. kl. Woch. 1899; Über die vitale Färbbarkeit der Phagozyten u. s. w. mit Neutralrot. A. f. mikrosk. Anat. 1900, LVI. — v. *Prowazek*, Vitalfärbungen mit Neutralrot an Protozoen. Zt. f. wiss. Zool. 1898, LXIII; Chlamydozoa (zusammenfassende Übersicht). A. f. Protistenkunde 1907, X, S. 337; Taschenbuch der mikroskopischen Technik der Protistenkunde. 2. Aufl., 1909; Einführung in die Physiologie der Einzelligen. 1910, S. 15. — *Reuter*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1901, XXX, S. 248. — *Romanowsky*, Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria (deutsch von P. *Werner*). Petersburg 1891. — *Rosenbusch*, Beihefte z. A. f. Schiffs- u. Tropenhyg. 1908; A. f. Protistenkunde 1909, XV, S. 263. — *Ross*, The thick film process u. s. w. Thompson Yates laboratories Rep. 1903, V, part. I, s. auch *Ruge*, Malaria-krankheiten. — *Ruge*, Malaria-Parasiten in *Kolle-Wassermann's* Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 2. Aufl., VII, Jena 1912. — *Schaudinn*, Studien über krankheitserregende Protozoen. Arb. a. d. kais. Ges., XIX, S. 169; Untersuchungen über den Generationswechsel bei Coccidien. Zool. Jahrb., Abt. f. Morphologie 1900 und Arb. a. d. kais. Ges. 1902, XVIII, H. 3. — *Schilling*, Tropenhygiene. Leipzig 1909. — *Schmorl*, Die pathol.-histologischen Untersuchungsmethoden. Leipzig 1909. — *Schöffner*, D. a. f. kl. Med. 1899, LXIV; 1901, LXXI. — *Szécsi*, Lucidol, ein neues Fixiermittel. D. med. Woch. 1913, Nr. 33. — *Tellyesniczky*, Über die Fixierungs- (Härtungs-) Flüssigkeiten. A. f. mik. Anat. 1898, LII. — *Unna*, A. f. mik. Anat. 1887, XXX: „Plasmazellen“ in: Enzykl. d. mikrosk. Technik. — *Ziemann*, Über Malaria und andere Blutparasiten. Jena 1898.

Die mikroskopische Darstellung des filtrierbaren Virus (Chlamydozoa-Strongyloplasmen).

Von Priv.-Doz. Dr. B. Lipschütz, Wien.

I. Allgemeiner Teil.

Die Technik der mikroskopischen Untersuchung der Chlamydozoa und Strongyloplasmen verwendet im allgemeinen die für die mikroskopische Darstellung der Bakterien überhaupt gebräuchlichen Verfahren, indes sind wir doch genötigt, sowohl bei der Anfertigung der mikroskopischen Präparate als auch für ihre tinktorielle Behandlung eine Reihe von Modifikationen anzuwenden, um die Schwierigkeit des mikroskopischen Studiums dieser erst in der letzten Zeit näher erforschten Gruppe von Kleinlebewesen zu überwinden.

Die außerordentliche Kleinheit der mikroskopischen Formen, ihre geringe Avidität zu den meisten unserer gewöhnlichen Farbstoffe sowie das eigenartige Verhalten des filtrierbaren Virus zu den Zellen des Wirtstieres schaffen für die Technik der mikroskopischen Untersuchung besondere Verhältnisse, die eine eigene Besprechung erfordern. Letztere kann allerdings nur dem jetzigen Stande der Erforschung der Chlamydozoa-Strongyloplasmen entsprechen und dürfte später noch eine Bereicherung sowie einen weiteren Ausbau erfahren. Auch muß hier angeführt werden, daß die mikroskopischen Befunde, deren Technik im vorliegenden Beitrag kurz geschildert werden soll, zwar leicht zu überprüfen sind und bereits eine Reihe von Bestätigungen gefunden haben, daß aber ihrer Deutung als Mikroorganismen noch nicht allgemein zugestimmt wird. Dementsprechend stellen die meisten der folgenden Angaben hauptsächlich nur die Ansichten einer verhältnismäßig kleinen Anzahl von Autoren, zu denen sich auch Verfasser rechnet, dar.

Die filtrierbaren Infektionserreger, deren Zahl mit jedem Jahr zunimmt und heute etwa 42 beträgt (*Lipschütz*, „Filtrierbare Infektionserreger“ im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle-Wassermann, 2. Aufl., S. 351), wurden in früheren Jahren, wegen der

Unmöglichkeit sie zur mikroskopischen Darstellung zu bringen, als „submikroskopische“, „ultramikroskopische“ oder „invisible“ Erreger bezeichnet, bis es durch die Untersuchungen von *Borrel*, *Nocard*, *Roux*, *v. Prowazek*, *Lipschütz*, *Volpino* u. a. gelungen war, eine Reihe mikroskopischer Befunde festzustellen, die wir mit größter Wahrscheinlichkeit als Erreger bezeichnen dürfen. Aus dieser großen Zahl der filtrierbaren Virusarten habe ich vor kurzem, von praktischen Gesichtspunkten ausgehend, als erste Gruppe die „Chlamydozoa-Strongyloplasmen“ ausgeschieden. Diese Gruppe umfaßt eine Reihe von Krankheiten, bei denen charakteristische mikroskopische Befunde bzw. „Einschlüsse“ konstant erhoben werden können. Die Erreger stellen kleinste, rundliche, schwer färbbare, durch hantelförmige Teilung sich vermehrende Gebilde dar: Strongyloplasmen (*Lipschütz*). Auf die Invasion des in den Zellen parasitierenden Virus treten bei den meisten Affektionen charakteristische Reaktionsprodukte auf, die unter dem Namen der „Einschlüsse“ oder „Körperchen“ bekannt sind und das Virus oder einzelne Virusstadien beherbergen bzw. mantelartig umhüllen: Chlamydozoa (*v. Prowazek*). Bei diesem vorläufigen Einteilungsversuch wurden als zweite Gruppe die „mikroskopisch unsichtbaren, filtrierbaren Infektionserreger“ aufgestellt; diese sind weder sichtbar, noch züchtbar und ihre Existenz erschließen wir bloß auf Grund ihres pathogenen Verhaltens bei der experimentellen Impfung oder zufälligen Infektion. Die im vorliegenden Beitrag abzuhandelnde Technik befaßt sich selbstverständlich nur mit der mikroskopischen Untersuchung der Chlamydozoa und Strongyloplasmen. Je nach dem Sitz und dem Verhalten der „Einschlüsse“ zu den Zellbestandteilen habe ich eine genauere Gruppierung der Chlamydozoa-Strongyloplasmen vorgenommen und unterscheide drei Gruppen:

1. Die Cytoookongruppe, gekennzeichnet durch die Ausbildung der „Zelleinschlüsse“ im Protoplasma der Zellen (*Molluscum*, *Vaccine*, *Trachom*, *Geflügelpocke*, *Lyssa* u. s. w.);

2. Die Karyookongruppe, bei der die Ausbildung der „Zelleinschlüsse“ im Kern erfolgt (*Herpes zoster*, *Herpes genitalis*, *Herpes febrilis*, *Varicellen*, *Polyederkrankheit der Raupen*, *Bornasche Krankheit* und *Virus myxomatsum*) und

3. die Cytokaryookongruppe, gekennzeichnet durch Auftreten der „Zelleinschlüsse“ im Protoplasma und im Kern (*Variola*, *Paravaccine*).

Es kommen für das Studium der Chlamydozoa-Strongyloplasmen folgende Methoden in Betracht, die der Reihe nach besprochen werden sollen:

1. der Nachweis im nativen Präparat,
2. die intravitale Färbung,

3. der mikroskopische Nachweis im gefärbten Ausstrichpräparat,
4. der Nachweis im Schnitt und
5. bei mehreren züchtbaren Erregern der mikroskopische Nachweis in Kulturausstrichen,

Wie schon aus dieser Aufzählung der Methoden und den noch später zu schildernden Verfahren hervorgeht, benützen wir für die mikroskopische Darstellung des filtrierbaren Virus keineswegs neue und etwa besonders komplizierte mikroskopische Arbeitsmethoden; es muß vielmehr betont werden, daß allein zielbewußte und konsequente Ausnutzung bereits allgemein eingebürgerter bakteriologischer Verfahren und vor allem namentlich die Benutzung der bereits von *Robert Koch* gelehrtens systematischen Untersuchung des pathologischen Substrates im nativen Zustand und im gefärbten Ausstrichpräparat vollkommen genügen, um zu neuen, konstant nachweisbaren und charakteristischen mikroskopischen Befunden zu gelangen, denen mit allergrößter Wahrscheinlichkeit ätiologische Bedeutung beigelegt werden darf. Es wird daher auch notwendig sein, allenthalben auf die betreffenden Abschnitte der allgemeinen bakteriologischen Technik zu verweisen, und es können hier nur die beim Studium des filtrierbaren Virus besonders in Betracht kommenden Methoden und Verfahren ausführlich geschildert werden.

Infolge der eigenartigen Gewebstropismen der filtrierbaren Infektionserreger ist das Untersuchungsmaterial außerordentlich verschiedenartig: das Pleuraexsudat bei der Peripneumonie der Rinder, das akanthotische Rete Malpighi beim Molluscum contagiosum, die Follikelpröpfe bei der Geflügelpocke, bei der Variola und Schafpocke der Pustelinhalt, bei der Paravaccine die abgehobene Kruste, das Zentralnervensystem bei der Poliomyelitis, der Blaseninhalt bei der Maul- und Klauenseuche u. s. w. Es ist klar, daß bei dieser Verschiedenheit der pathologischen Substrate keine allgemein anwendbare Regel für die mikroskopische Untersuchung der filtrierbaren Infektionserreger gegeben werden kann, daß vielmehr, je nach dem einzelnen Fall, das Vorgehen sich anders gestalten wird. In der Regel können wir beim Studium des filtrierbaren Virus den sich darbietenden Aggregatzustand des pathologischen Substrates nicht direkt benutzen, sei es, daß es sich um kompakte Gewebekomplexe handelt, die erst einer gewissen Vorbehandlung unterzogen werden müssen, sei es, daß die Erreger in derart enormen Mengen in den geringsten Partikelchen des krankhaften Gewebes enthalten sind, daß zum Zwecke einer genauen und eingehenden mikroskopischen Untersuchung eine Verdünnung des Materiales sich als notwendig erweist. So empfiehlt es sich beispielsweise, die Vaccinelymphe 1000fach zu verdünnen, um klare, instruktive und für photographische Aufnahmen brauchbare Präparate zu erhalten; bei der Geflügelpocke oder Molluscum ist es notwendig, ein kleines Partikelchen des pathologischen Gewebes mit einigen Tropfen Aqua destillata oder steriler physiologi-

scher Kochsalzlösung zu verreiben, um den Nachweis der Strongyloplasmen im nativen oder gefärbten Präparat zu erbringen, während beim Trachom Abstrichpräparate des erkrankten Schleimhautepithels angefertigt werden müssen. Die zweckentsprechende Vorbereitung des Untersuchungsmateriales stellt meines Erachtens den für das Gelingen des mikroskopischen Nachweises der Erreger ungleich wichtigeren Teil dar, während, wie bereits erwähnt wurde, die Technik ihrer mikroskopischen Untersuchung sich mit der der Bakterien überhaupt größtenteils deckt.

1. Nachweis des filtrierbaren Virus im nativen Präparat.

Der „hängende Tropfen“ erweist sich für die mikroskopische Untersuchung des nativen Präparates unbrauchbar; es empfiehlt sich vielmehr, einen kleinen Tropfen des Untersuchungsmateriales (Gewebs-*emulsion*, verdünnter Pustelinhalt u. s. w.) auf die Mitte eines gut gereinigten Objektträgers zu geben und mit dem Deckgläschen zu bedecken, um die Untersuchung in dünner Schicht vorzunehmen. Als *Nativverfahren* wird auch von *r. Prowazek* empfohlen, das Material auf dem Deckgläschen eintrocknen zu lassen und, auf Wachsfüßchen montiert, ohne Einschlußmedium zu untersuchen. Ich habe in der letzten Zeit dieses Verfahren mit der Untersuchung im Dunkelfeld vorteilhaft kombiniert in der Weise, daß das am Objektträger eingetrocknete Material, mit der Schichtseite nach oben, der üblichen Besichtigung im Dunkelfeld unterzogen wird.

Erforderlich sind für die native Untersuchung ein gutes optisches System, eine starke meist künstliche Lichtquelle (Auerlampe) und vor allem ein mikroskopisch geübtes Auge.

Wegen der besonderen Kleinheit der Strongyloplasmen (deren Durchmesser um $\frac{1}{4} \mu$ schwankt) und ihres meist geringen Lichtbrechungsvermögens kann an Stelle der nativen Untersuchung mit den gewöhnlichen Vorrichtungen des Mikroskops mit Vorteil die Untersuchung bei Dunkelfeldbeleuchtung vorgenommen werden (über letztere siehe den betreffenden Abschnitt im vorliegenden Handbuch von *Busson*). Die Elementarkörperchen (Strongyloplasmen) lassen sich dann in der Regel leicht nachweisen, jedoch müssen hier zwei Punkte besonders hervorgehoben werden: 1. genügt diese Untersuchung bei Dunkelfeldbeleuchtung keinesfalls, um das filtrierbare Virus mit Sicherheit zu erkennen, da zweifellos leblose kolloidale Körperchen den Strongyloplasmen oft sehr ähnlich sehen können. Es muß daher diese Untersuchung stets mit der Kontrolle durch das gefärbte Ausstrichpräparat kombiniert werden; 2. auf diesem Wege konnte bisher kein neuer Befund auf dem Gebiete der mikroskopischen Erforschung des filtrierbaren Virus festgestellt werden, der nicht auch färbereich hätte gewonnen werden können. Es kommt daher diesem Verfahren der

nativen Untersuchung nur eine beschränkte Bedeutung zu und *Remlinger* hat bereits vor mehreren Jahren hervorgehoben, daß die ultramikroskopische Untersuchung die von bakteriologischer Seite in sie gesetzten Hoffnungen nicht erfüllt hat. (Negative Befunde bei der Hühnerpest — *Rosenthal*, *Agalactia contagiosa* — *Celli* u. *de Blasi*, Gelbfieber — *Otto* u. *Neumann* u. s. w.)

Auch das *Burr'sche* Tuscheverfahren, das sich bei der Untersuchung von Bakterien, Spirochäten u. s. w. so sehr bewährt, kommt für die native Untersuchung des filtrierbaren Virus wegen der Kleinheit der Strongyloplasmen nur sehr wenig in Betracht; *v. Prowazek* konnte sich seiner mit Erfolg beim Studium der Gelbsucht der Seidenraupen bedienen, während nach den Erfahrungen *Paschens* bei der Vaccine die Methode viel zu unsicher ist, um eine sichere Unterscheidung der „Elementarkörperchen“ zu ermöglichen.

2. Die intravitale Färbung.

Diese besitzt für die mikroskopische Darstellung des filtrierbaren Virus nur untergeordnete Bedeutung, da sie bei vielen Infektionserregern versagt. Die Elementarkörperchen des *Molluscum* färben sich intravital mit Brillantkresylblau, hingegen nehmen die *Variolae*hlamydozoen weder diesen Farbstoff, noch Neutralrot an (*v. Prowazek*). Bei der Gelbsucht der Raupen verwendete *v. Prowazek* für intravitale Färbungen Azur II, Methylenblau medicinale, Brillantkresylblau und Neutralrot in 1%iger Lösung, ferner 5% Neutralrot + 5% Methylenblau. Beim Fleckfieber gelang es diesem Forscher, die in den Leukocyten parasitierenden Strongyloplasmen intravital mit Azur II oder nach dem Vorgange von *da Rocha-Lima* mit unverdünnter *Giemsa*-Lösung zu färben. Die Technik gestaltet sich folgendermaßen: Ein kleiner Tropfen der Farblösung wird auf den gut gereinigten Objektträger ausgestrichen und hierauf im Brutschrank eintrocknen gelassen, worauf das Untersuchungsmaterial zugesetzt und rasch untersucht wird. Letzteres muß wegen der Veränderlichkeit und Flüchtigkeit der Vitalfärbungen geschehen.

3. Mikroskopischer Nachweis im gefärbten Ausstrichpräparat.

Dieser stellt die exakteste Methode des mikroskopischen Studiums des filtrierbaren Virus dar. Man verwendet: a) Ausstrichpräparate, die nach Art der Gewinnung von Blutpräparaten hergestellt werden (*Borrel*, *Lipschütz*, *v. Prowazek*, *Paschen*, *Volpino* u. s. w.). Um klare Bilder zu erlangen, müssen, wie bereits einmal ausgeführt wurde, Verdünnungen des Ausgangsmateriales oder Emulsionen des pathologischen Gewebes verwendet werden. Die zelligen Elemente werden jedoch bei diesem Verfahren oft in ihrem Verband gelockert und meist auch schlecht konserviert; b) Klatzschpräparate, bei denen der

Situs der intracellulär gelegenen Erreger meist vollkommen gewahrt wird. Diese Methode wurde zuerst von *Ewing* beim Studium der vacinierten Cornea, später von *Lipschütz* beim Molluscum angewendet. Derart exakt angefertigte Klatschpräparate können sich sogar dem eingebetteten Schnitt überlegen erweisen.

Zur Fixation der lufttrockenen Präparate verwendet man Alcohol absolutus, Alkoholäther aa. oder Methylalkohol. Auch die Fixation mit Osmiumdämpfen wird für das Virus der Variola, Geflügelpocke und Molluscum empfohlen. Für *Giemsa*-Färbungen erweist sich ferner die feuchte Fixation der Ausstriche in Sublimatalkohol nach *Schaudinn* (2 Teile konzentrierte wässrige Sublimatlösung und 1 Teil Alcohol absolutus) durch mehrere Stunden von besonderem Vorteil.

Die Strongyloplasmen sind schwer färbbare Mikroorganismen. Mit den gewöhnlichen Farbstoffen nehmen sie selbst bei protrahierter Behandlung die Farbe nicht an; ebensowenig gestattet die Färbung mit Hämalaun, Hämatoxylin, mit Eosin-Methylenblau-Gemischen (*Jenner*, *May-Grünwald*, *Leishmann*) das Gewinnen gut gefärbter, mikroskopisch einwandfreier Präparate (*Licheri*). Bei der Behandlung mit *Ziehlschem* Fuchsin oder mit Carbol-Gentianaviolett-Lösung färben sich bloß einzelne Strongyloplasmen sehr schwach, so daß wir diese Methoden für das wissenschaftliche Studium des filtrierbaren Virus nicht empfehlen können.

Im Gegensatz zu diesen wenig oder überhaupt unbrauchbaren Verfahren haben sich die Färbemethoden mit *Löfflers* Geißelbeize und ferner die *Giemsa*-Färbung als vorzüglich für den mikroskopischen Nachweis der Chlamydozoa und Strongyloplasmen erwiesen.

Die *Löfflersche* Geißelfärbungsmethode wurde zuerst von *Borrel* beim Studium der Geflügelpocke verwendet; später bezeichnete dieser Forscher die Beizmethode als das geeignetste Verfahren, um sog. „unsichtbare“ Erreger mikroskopisch darzustellen. Die *Giemsa*-Färbung wurde zuerst von *Lipschütz* beim Molluscum und später bei der Geflügelpocke benutzt, beim Trachom von *Halberstädter* und *v. Prowazek*, bei der Vaccine von *Paschen*, *v. Prowazek*, *Volpino* u. a. verwendet.

Die Strongyloplasmen zeigen zu den genannten zwei Färbeverfahren verschiedene Aviditäten, so daß manche von ihnen gleich gut nach beiden, andere wiederum besser nach der einen als nach der anderen Methode darstellbar sind, worauf noch im speziellen Teil näher eingegangen werden soll. In gut gelungenen Präparaten erscheinen die Strongyloplasmen rötlich bis violettrot bei der *Giemsa*-Färbung, während sie in *Löffler*-Präparaten einen leuchtend dunkelroten Farbenton annehmen.

Die *Löfflersche* Beizmethode wird genau nach den Angaben dieses Autors (s. den entsprechenden Abschnitt dieses Handbuches), jedoch

ohne Laugen- oder Säurezusatz ausgeführt. In vielen Fällen empfiehlt es sich jedoch, eine Reihe kleiner Modifikationen einzufügen, um, namentlich durch Entfernen der noch anhaftenden geringen Serumreste, vollkommen klare, keine Spur von Farbstoffniederschlägen zeigende Präparate mit hellem, kaum oder gar nicht mitgefärbtem Untergrund zu erlangen. Dies erreichen wir nach dem Vorgehen von *Paschen* durch Einlegen der lufttrockenen Präparate in Wasser, worauf die Fixation der dünnen Ausstriche in Alkohol und ihre Färbung erfolgt.

Paul gibt die Technik der Untersuchung der Variola- und Vaccinestrongyloplasmen nach *Paschen* folgendermaßen an:

1. Anritzen der Pustel mit der Ecke eines Deckglases; 2. den austretenden Inhalt mit der Kante eines Deckglases aufnehmen und auf Objektträger wie bei Blutpräparaten austreichen; 3. Ausstrich lufttrocknen; 4. die beschickten Objektträger senkrecht in ein Gefäß mit destilliertem Wasser auf 5—10 Minuten hineinstellen (ältere Präparate noch länger); 5. Trocknung in senkrechter Stellung; 6. fixieren in absolutem Alkohol 1—24 Stunden oder in Methylalkohol 5—15 Minuten; 7. trocknen; 8. übergießen mit sorgfältig filtrierter *Löffler*-Beize, erwärmen über der Flamme, bis Dampf aufsteigt; 9. sorgfältig mit destilliertem Wasser abspülen; 10. übergießen mit unverdünnter, sorgfältig filtrierter *Ziehlscher* Carbofuchsinlösung, erwärmen über der Flamme bis zur Dampfentwicklung; 11. abspülen mit destilliertem Wasser, bei Überfärbung einen Augenblick in absoluten Alkohol eintauchen oder in 5%ige Tanninlösung, Abspülung; 12. trocknen mit Fließpapier und einschließen in Zedernöl oder Kanadabalsam.

Das zweite wichtige Verfahren der mikroskopischen Darstellung des filtrierbaren Virus im Deckglaspräparat ist die *Giemsa*-Färbung. Sie erfolgt sowohl nach trockener als auch nach feuchter Fixation. Man färbt in der üblichen Verdünnung des *Giemsa*-Farbstoffes (1 Tropfen der Stammlösung auf 1 cm³ dest. Wasser) bei Zimmertemperatur. (Andere Verdünnungen der käuflichen *Giemsa*-Lösung, die von einzelnen Autoren empfohlen werden, haben sich größtenteils als überflüssig erwiesen.) In einzelnen Fällen erweist sich dabei das Einstellen der Farbflotte in den Brutschrank bei 37° von Vorteil (*Lipschütz*). Auch die *Schaudinn*sche Modifikationen der *Giemsa*-Färbung (12 Teile *Giemsa*s Eosinlösung [25 cm³ einer 1%igen französischen Eosinlösung auf 500 cm³ Wasser], 3 Teile Azur I [in der Verdünnung 1 : 1000] und 3 Teile Azur II [in der Verdünnung 0.8 : 1000]) wurde erfolgreich beim Nachweis der Trachomeinschlüsse von *Halberstädter* und *v. Prowazek* verwendet. Schließlich wurden Modifikationen der *Giemsa*-Färbung beim Studium des Trachoms (*Lindner*), der Poliomyelitis u. s. w. vorgeschlagen, die im speziellen Teil näher beschrieben werden sollen. Auch die Versilberungsmethode von *Fontana* mit Nachfärbung (Carbolthionin-*Fontana* oder Carbofuchsin-*Lipschütz*) läßt die Strongyloplasmen ungemein scharf hervortreten.

Über das Verhalten des filtrierbaren Virus zur Gramschen Färbung sei erwähnt, daß, soweit bisher systematische Untersuchungen vorliegen, sämtliche Erreger bei der Alkoholbehandlung die Farbe wieder abgeben; eine Ausnahme von dieser Regel stellt nur das von *Flexner* und *Noguchi* entdeckte Virus der Poliomyelitis dar, welches gramfest ist.

4. Histologischer Nachweis des filtrierbaren Virus.

Bei der außerordentlichen Kleinheit der Elementarkörperchen und ihren geringen tinktoriellen Aviditäten können sich Schwierigkeiten bei ihrem Nachweis im Schnitt ergeben. Mit Hilfe bestimmter Fixationsmethoden, die oft gleichzeitig mit einer Beizung einhergehen, sowie durch prolongierte *Giemsa*-Färbung oder mit Hilfe der Silberimprägnationsmethoden ist es namentlich in den letzten Jahren gelungen, auch hier Fortschritte zu erzielen. Diese sind hauptsächlich deswegen von Wichtigkeit, weil sie eine Übereinstimmung der mikroskopischen Bilder im Ausstrich und Schnitt demonstrieren und sowohl durch die außerordentliche Menge des histologisch nachgewiesenen Virus als auch durch die Feststellung seiner innigen Beziehungen zu den befallenen Wirtszellen geeignet sind, die bei den meisten filtrierbaren Infektionserregern noch fehlenden Reinkulturen bis zu einem gewissen Grad zu ersetzen und daher mit großer Sicherheit für die ätiologische Bedeutung der erhobenen Befunde sprechen.

Der histologische Nachweis des Virus ist bisher bei einer größeren Anzahl von Krankheiten gelungen: Vaccine (*Paschen*), Variola (*v. Prowazek* und *Yamamoto*), Molluscum contagiosum (*Lipschütz*), Trachom (*Halberstädter* und *v. Prowazek*), Schafpocke (*Borrel*), Geflügelpocke (*da Rocha-Lima*), Verruga peruviana (*da Rocha-Lima*) und Poliomyelitis (*Flexner* und *Noguchi*).

Es gelangten folgende Methoden zur Anwendung:

1. Die feuchte *Giemsa*-Färbung nach Sublimatalkoholfixation (*Giemsa*) bei Trachom, Molluscum und Variola.

2. Die *Giemsa*-Färbung nach Fixation in Carnoyscher Flüssigkeit wurde von *da Rocha-Lima* für den Nachweis der Elementarkörperchen bei der Geflügelpocke verwendet. Man fixiert nach meinen Erfahrungen am besten 24 Stunden in der aus Chloroform, Alcohol absolutus und Eisessig aa. zusammengesetzten Fixierflüssigkeit, dann Härtung in absolutem Alkohol, Xylol und Paraffineinbettung. Die Schnitte bleiben mehrere Stunden in verdünnter *Giemsa*-Lösung (1 Tropfen auf 1 cm^3 dest. Wasser), dann differenzieren mit Xylol-Aceton-Gemischen, Xylol, einschließen in Zedernöl.

3. Für den histologischen Nachweis des Poliomyelitisvirus wurde vor kurzem die Anwendung der *Giemsa*-Färbung nach Lucidolfixation (*Amoss*) empfohlen (s. spezieller Teil).

4. *Borrel* benutzt für die Schnittfärbung bei der Schafpocke folgendes Verfahren: Zur Fixation wird *Flemmingsche* Lösung oder fol-

gendes Gemisch verwendet: Acid. osmic. 2·0, Acid. chromic. 3·0, Platinchlorid 2·0, Acid. acetic. 20·0, Aq. dest. 350·0. Gefärbt wird mit einer wässerigen Lösung von Magentarot mit oder ohne Carbolzusatz 10 bis 15 Minuten bei 50°. Dann Behandeln der Schnitte durch 5 Minuten mit einer Pikroindigocarminlösung, die aus 2 Teilen einer gesättigten Indigocarminlösung und 1 Teil einer gesättigt wässerigen Pikrinsäurelösung besteht. Dann rasch mit Wasser abspülen, überführen durch Alkoholreihen, aufhellen und einschließen.

Die Methode gelingt nur an äußerst dünnen Schnitten, wie sie beispielsweise von der *Glissonschen* Kapsel oder von dem Pleuraüberzug gewonnen werden können.

5. *Radziejewski* und *Herzog* benutzen das *Eisenhämatoxylin*-Verfahren für die Färbung von Schnittpräparaten bei Trachom.

Herzog empfiehlt folgendes Verfahren: Die möglichst kleinen Exciisionsstückchen werden in bis auf 50° erwärmter Sublimatlösung (3% + 3% Eisessig) 1 Stunde fixiert, dann abspülen in Wasser, rasches Überführen durch verdünnten Alkohol in Alcohol absolutus, jodierter Alcohol absolutus, auswaschen des Jods in Alcohol absolutus, helles Anilinöl bis zu vollständiger Transparenz des Stückchens unter mehrfachem Wechsel des Anilinöls. Xylol und Paraffineinbettung. Die 5 μ dünnen aufgeklebten Schnitte werden 2—3 Tage in zur Hälfte verdünntem *Weigertschen* Hämatoxylin gefärbt. in 1½—4%iger Eisen-Alaun-Lösung oder in 30%iger Essigsäure differenziert. Das Chromatingerüst der ruhenden Epithelzellkerne muß eine deutliche Hämatoxylinfärbung behalten.

6. Für Schnittuntersuchungen der Trachomechlamydozoen empfehlen *Halberstädter* und *r. Prowazek* auch die *Mallorysche* Färbung, die sie folgendermaßen anwenden:

- a) Fixation in Sublimat;
- b) 10 Minuten langes Verweilen der Schnitte in einer 1%igen wässerigen Säurefuchsinlösung, auswaschen;
- c) 5 Minuten in einer 1%igen wässerigen Phosphor-Molybdänsäure-Lösung, gut gewaschen;
- d) dann 15—20 Minuten in ein Gemisch von gleichen Teilen von Anilinblau (½%ig), Orange G (2%ig) und Oxalsäure (2%ige Lösung);
- e) Wasser, rasch Alkoholreihen, Xylol, Kanadabalsam.

7. *Lindner* verwendet für die histologische Darstellung der Trachomeinschlüsse die sog. „Kontrastfärbung“:

- a) Fixation in Sublimat oder Formol;
- b) Färben 8—12 Stunden in der von *Lindner* angegebenen *Giemsa*-Lösung: 10 cm³ dest. Wasser, 5 Tropfen *Giemsa*-Lösung, 1 Tropfen 1%iger Essigsäure;
- c) Alcohol absolutus, Xylol, Zedernöl.

Einschlüsse färben sich dunkelblau, Kerne der Lympho- und Leukocyten blau bis bläulich, Epithelzellenkerne eine Spur weniger rot als ihr Protoplasma.

8. Die Silberimprägnationsmethode nach *Volpino-Levaditi*, die von *Paschen* beim Studium der Vaccine und von *da Rocha-Lima* bei der *Verruga peruviana* benutzt wird.

Soweit die hier angeführten Methoden keine eingehende Beschreibung gefunden haben, sind sie, um Wiederholungen zu vermeiden, an den entsprechenden Stellen dieses Handbuchs (s. *Joannovics*, Methoden der Färbung von Mikroorganismen im Schnitt), wo sie ausführlich abgehandelt werden, nachzulesen.

Neben diesen wichtigeren Methoden des histologischen Nachweises der Strongyloplasmen werden noch einige andere Verfahren empfohlen (so aus jüngster Zeit von *Leschke* eine Carbofuchsin-Pikrinsäure-Färbung bei der *Landry'schen* Paralyse), auf die wir im speziellen Teil noch kurz eingehen werden.

5. Mikroskopischer Nachweis in der Kultur.

Die filtrierbaren Infektionserreger sind schwer züchtbare Mikroben: bisher ist es auch nur bei einzelnen dieser Keime gelungen, zu positiven Kulturergebnissen zu gelangen. Sie beanspruchen für ihr Gedeihen auf künstlichen Nährmedien Zusatz von Blut oder eiweißhaltigen Flüssigkeiten zu in besonderer Weise hergestellter Bouillon und keimen meist anaerob aus. Die technischen Schwierigkeiten der Reinzüchtung müssen im einzelnen Fall, also bei jedem filtrierbaren Infektionserreger in besonderen Untersuchungen überwunden werden und es lassen sich daher diesbezüglich keine allgemeinen Regeln aufstellen. Soweit bisher positive Resultate von wissenschaftlich einwandfreier Seite vorliegen, werden sie im speziellen Teil angeführt werden. Sehen wir von den unsicheren Ergebnissen der kulturellen Untersuchungen bei der Vaccine (*Pröschel*, *Licheri*, *Casagrandi*, *Fornet*) ab, so bereitet der mikroskopische Nachweis der Strongyloplasmen in den bisher gelungenen Reinkulturen bei der Peripneumonie der Rinder (*Nocard* und *Roux*), Molluscum (*Leber*), Poliomyelitis (*Ferner* und *Noguchi*), Geflügeldiphtherie (*Bordet*) sowie bei den noch fraglichen Ergebnissen der Züchtung des Lyssa- und Trachomvirus (*Noguchi*) keinerlei Schwierigkeiten. Er erfolgt nach vollkommen ähnlichen Verfahren wie die färbende Darstellung der Strongyloplasmen im Ausstrichpräparat (s. oben). Man verwendet daher entweder *Löffler's* Beizmethode (Molluscum) oder färbt nach *Giemsa* (bei Poliomyelitis, Lyssa) nach vorausgegangener Fixation in Methylalkohol. Nur für den *Asterococcus mycoides*, den Erreger der Peripneumonie der Rinder, kommen für Kulturausstriche auch gewöhnliche Färbemethoden, wie Carbolgentianaviolett, in Betracht.

Anhangsweise soll hier in Kürze die Trennung der Strongyloplasmen von gewissen ihnen im mikroskopischen Bild ähnlichen Körper-

chen, Granula u. s. w., besprochen werden. Schon bei der nativen Untersuchung in Dunkelfeldbeleuchtung können kleinste, in großer Zahl vorkommende, rundliche oder mehr weniger regelmäßige Formen aufweisende granulaartige Partikelchen Schwierigkeiten bereiten. Diesbezüglich sei erwähnt, daß derartige Granula bei der nativen Untersuchung oft glitzern, während die Elementarkörperchen reinweiß oder grauweiß und von ausgesprochen rundlicher, regelmäßiger Gestalt erscheinen. Immerhin kann es dabei oft sehr schwer sein, eine sichere Entscheidung zu treffen. Aber auch im gefärbten Ausstrichpräparat können unter Umständen Körperchen verschiedener Größe und Gestalt (Einzelkörperchen, Diploformen u. s. w.), meist Derivate des Chromatins oder Plastins Anlaß zu Verwechslungen mit Strongyloplasmen geben. Hier kann nur eine gewisse Übung und Vertrautheit mit den mikroskopischen Bildern des filtrierbaren Virus sowie exakte Beherrschung der Untersuchungstechnik (richtige Herstellung der Präparate, Vermeiden von Farbstoffniederschlägen u. s. w.) und schließlich der Vergleich mit einem guten Testpräparat vor Irrtümern schützen. Es ist daher auch (wie ich *Huntentmüller* gegenüber ausdrücklich betonen muß) unstatthaft, die mikroskopische Diagnose des filtrierbaren Virus auf Grund des Vorhandenseins eines oder weniger rundlicher, kleinster, nach *Löffler* oder *Giemsa* gefärbter Körperchen zu machen, vielmehr müssen folgende wichtige Merkmale bei der Beurteilung der mikroskopischen Präparate genauestens berücksichtigt werden: Vorkommen der Körperchen in enormen Mengen, Vorhandensein von Diploformen und von Teilungsstadien darstellenden Biskuitformen, sehr geringer Durchmesser ($0.2\text{--}0.25\ \mu$), rötlich-violetter Farbenton bei der *Giemsa*-Färbung oder leuchtend rote Farbennuance bei der Behandlung mit der *Löfflerschen* Beizmethode und schließlich der bei vielen filtrierbaren Virusarten meist unschwer zu erbringende Nachweis der innigen Beziehungen dieser Körperchen zu den Zellen des Wirtstieres, in welchen sie häufig in kompakten Haufen, in einer sehr schwach gefärbten Grund- oder Bindesubstanz eingebettet, haufenartig angetroffen werden. Dem einigermaßen geübten Untersucher dürfte auf Grund aller dieser Kennzeichen die mikroskopische Diagnose des filtrierbaren Virus keine Schwierigkeiten bereiten.

6. Mikroskopische Darstellung der „Gewebeinschlüsse“.

Der mikroskopische Nachweis der als Reaktionsprodukt des Gewebes auf das Eindringen und die Vermehrung des filtrierbaren Virus auftretenden „Einschlüsse“ erfolgt im nativen und im gefärbten Präparat nach allgemein gültigen histologischen Regeln und bietet daher keinerlei technische Schwierigkeiten. Nur soweit an dem Aufbau der „Einschlüsse“ sich auch die als Träger des Virus in Betracht kommenden „Elementarkörperchen“ (und „Initialformen“ bei Vaccine und Trachom)

beteiligen, gelangen besondere histologische Färbemethoden zur Anwendung, die im vorhergehenden Kapitel beschrieben worden sind.

Zur Fixation der Gewebe verwendet man Alkohol, Formalin, wässerige Sublimatlösung, Sublimatalkohol nach *Schaudinn*, *Zenkersche*, *Hermannsche* oder *Flemmingsche* Fixierflüssigkeit oder die oben erwähnte *Borrelsche* Mischung. Gefärbt wird mit Hämatoxylin-Eosin, nach *van Gieson*, nach *Mallory*, mit *Heidenhains* Eisenhämatoxylin, mit *Pappenheims* Methylgrünpyronin (Hühnerpest, Molluscum), mit Triacid (Hühnerpest), mit Magentarot und Pikroindigocarmin nach *Borrel*, ferner nach *Leishman*, nach *Mann*, *Lentz* oder *May-Grünwald* u. s. w. Auch die *Giemsa*-Färbung, namentlich die feuchte Färbung nach Sublimatalkoholfixation kann sowohl für Schnittuntersuchungen als auch für den Nachweis der Einschlüsse in nach allgemein bakteriologischen Regeln angefertigten Ausstrich- und Klatschpräparaten besonders empfohlen werden. Soweit diesen Methoden Bedeutung zukommt, werden sie im speziellen Teil noch Erwähnung finden, im übrigen muß die genaue Technik ihrer Handhabung in den histologischen Lehr- und Handbüchern sowie in den betreffenden Kapiteln dieses Handbuches nachgelesen werden.

II. Spezieller Teil.

In diesem Abschnitt sollen unter Zugrundelegung eines einheitlichen Schemas die wichtigsten Angaben über die mikroskopische Untersuchungstechnik der einzelnen filtrierbaren Infektionserreger gemacht werden. Selbstverständlich muß diese Darstellung bei dem heutigen Standpunkt unserer diesbezüglichen Kenntnisse noch recht lückenhaft ausfallen. Soweit bereits genauere Angaben im allgemeinen Teil vorliegen, soll auf sie stets verwiesen werden.

1. Lokalisierte epidermale bzw. epitheliale Vira.

Molluscum contagiosum (*Strongyloplasma hominis*
Lipschütz).

Das akanthotische Rete Malpighi stellt das Untersuchungsmaterial dar. Nach Spaltung der das Molluscum bedeckenden dünnen Epidermisschicht hebt man das Gebilde durch seitlichen Druck aus seinem bindegewebigen Bett heraus. Kleinste Partikelchen des Molluscum werden unter Zusatz einiger Tropfen Wasser fein verrieben und mit der Emulsion Ausstrichpräparate angefertigt. Auch Klatschpräparate sind für die Demonstration der enorm großen Strongyloplasmamenngen empfehlenswert. *v. Prowazek* verwendet folgendes Verfahren: Es wird ein Tropfen Wasser auf das Molluscum gegeben und seine Oberfläche etwas abgeschabt, bis der Wassertropfen sich leicht trübt: letzterer dient hierauf zur Anfertigung der Präparate. Die native Unter-

suchung gelingt sehr leicht. Intravital sind die Molluscumstrongyloplasmen mit Brillantkresylblau färbbar. Für Deckglasausstriche verwendet man die *Löfflersche* Beizmethode oder prolongierte *Giemsa*-Färbung; für Schnittuntersuchung kommt die feuchte *Giemsa*-Färbung nach Sublimatalkoholfixation für die Darstellung der Strongyloplasmen in Betracht, während für das Studium der Gewebeeinschlüsse mit Vorteil die *Pappenheimsche* Färbung mit Methylgrünpyronin verwendet werden kann. Die „Molluscumkörper“ nehmen basische Anilinfarbstoffe leicht an. Auch die Methode von *Pitsfield*, bzw. deren Modifikation nach *Benignetti* und *Gino* dient zur Darstellung der Molluscumstrongyloplasmen (*Lipschütz*):

Zu 5 cm³ einer konzentriert wässerigen Alaunlösung werden ebenso viele Kubikzentimeter einer Tanninzinksulfatlösung (nach der Formel: Zinc. sulfur. 1·0, Tannin 10·0, Aqua dest. 100·0) und 3 cm³ einer konzentriert alkoholischen Gentianaviolettlösung zugefügt. Aufschütten der Farblösung auf das Deckglas und mehrfaches Erwärmen über dem Bunsenbrenner bis zum Aufsteigen starker Dämpfe, wobei das Sieden der Farblösung vermieden werden soll. Die Strongyloplasmen erscheinen dunkelblau-violett gefärbt.

Die Kultur der Molluscumstrongyloplasmen ist *Leber* unter anaeroben Bedingungen in Serumbouillon geglückt; *Leber* beschreibt in den mit *Löfflers* Beizmethode gefärbten Kulturausstrichen Körperchen, die mit den Molluscumstrongyloplasmen vollkommen übereinstimmen. Die Technik der Züchtung gestaltet sich folgendermaßen: das steril aus der Tiefe entnommene Gewebsmaterial wird in einen kleinen Tropfen jeweils frisch in sterilen Capillarpipetten entnommenen menschlichen Serums übertragen und mit diesem über einem hohlgeschliffenen Objektträger luftdicht abgeschlossen. Züchtung bei 28° und 37°. Nach 48 Stunden makroskopisch wahrnehmbare deutliche Trübung des Serums; mikroskopisch wurde die Vermehrung der Elementarkörperchen auch in weiteren Generationen (bis zur zehnten) bei progressiver Verdünnung des Ausgangsmateriales nachgewiesen. Die Übertragung mit Kultur ist jedoch bisher *Leber* nicht einwandfrei gelungen, was vielleicht mit der schweren Haftbarkeit auch des Ausgangsmateriales (auch in einer Reihe eigener Versuche) zusammenhängen dürfte.

Trachom (*Chlamydozoon trachomatis Halberstädter* und *v. Prowazek*).

Für die Erzielung guter Präparate ist die Technik der Materialentnahme ausschlaggebend. Da möglichst viele Epithelzellen untersucht werden sollen, überfährt man schabend in einem Zuge (*Halberstädter*) die Conjunctiva des umgestülpten Lides mit dem Rande eines nicht zu dünnen Deckgläschens oder eines Objektträgers. Besteht

starke Sekretion, so muß das Auge sorgfältig vom Eiter befreit werden: auch Schleim- und Blutbeimengung ist zu vermeiden. Das Material wird nach Art von Blutpräparaten ausgestrichen, Verreiben mit der Platinöse wie beim Anfertigen von bakteriologischen Präparaten ist ganz unzweckmäßig (*Halberstädter*).

Die native Untersuchung ist für das Studium der Trachomchlamydozoen von geringer Bedeutung. Mit dem Tuscheverfahren von *Burri* gelingt es, die „Trachomkörperchen“ (*Flemming*), ebenso die Initialformen (*Lindner*) zur Darstellung zu bringen. Die Fixation der Ausstriche erfolgt nach den im allgemeinen Teil gegebenen Vorschriften. Gefärbt wird in der Regel nach *Giemsa* oder mit der *Schaudinn*schen Modifikation der *Giemsa*-Färbung. Mit *Löffler*s Beizmethode nehmen die „Elementarkörperchen“ des Trachoms nur schlecht die Farbe an.

Für die exakte Darstellung der „Initialkörperchen“ empfiehlt *Lindner* eine von ihm als Kontrastfärbung bezeichnete Modifikation der *Giemsa*-Färbung, welche auf der starken Basophilie dieser Gebilde beruht. Die lufttrockenen, in absolutem Alkohol fixierten Deckglasausstriche werden auf folgender Lösung schwimmen gelassen: 10 cm³ Aq. dest., 5 Tropfen *Giemsa*-Lösung, 1 Tropfen 1%ige Essigsäure. 1 Stunde färben, trocknen und einschließen in Zedernöl: oder färben in folgender Lösung: 10 Tropfen *Giemsa*-Lösung, 10 Tropfen 1/2%ige Essigsäure, durch 10 Minuten, abspülen in Aqua destill., trocknen und einschließen.

Leber und *Hartmann* empfehlen zur Färbung von Ausstrichpräparaten *Heidenhain*s Eisenhämatoxylin nach feuchter Fixation in Sublimatalkohol oder *Hermann*scher Flüssigkeit.

Für Schnittpräparate kommen das Eisenhämatoxylinverfahren, die *Lindner*sche Kontrastfärbung, die Färbung nach *Mallory* und die feuchte *Giemsa*-Färbung zur Anwendung (s. Allgemeiner Teil).

Reinkulturen des Trachomvirus wollen *Noguchi* und *Cohen* in der letzten Zeit erhalten haben. Als Züchtungsmethode wurde das von *Noguchi* für die Kultur der *Spirochaeta pallida* und des Poliomyelitisvirus verwendete Verfahren (anaerobe Züchtung in Ascitesröhrchen, die ein steriles Gewebstück enthalten) benutzt. Die Autoren beschreiben in Ausstrichpräparaten der Kultur, die mit Carbofuchsin oder Gentianaviolett gefärbt wurden, kleinste, in großen Mengen vorkommende stronglyoplasmaähnliche Körperchen („Elementarkörperchen“): die Reinkulturen zeigten sich jedoch für die Affenconjunctiva unschädlich.

Die Technik der mikroskopischen Untersuchung der Epitheliosis desquamativa conjunctivae der Südsee (*Leber* u. v. *Prowazek*), der Einschlußblennorrhöe der Neugeborenen sowie der Einschlußblennorrhöe des männlichen und weiblichen Genitales und ferner der von *Uhlenhuth* und *Böing* bei der Schweinepest in Abstrichen der Bindehaut

nachgewiesenen, den Trachomchlamydozoen äußerst ähnlich sehenden Einschlüsse entspricht genau den oben für Trachom gemachten Angaben.

Paravaccine (*Strongyloplasma paravaccinae*
Lipschütz).

Für den Nachweis der Strongyloplasmen ist die Art der Materialentnahme wichtig; entsprechend der Lokalisation der „Zelleinschlüsse“ in den obersten Zellagen des Rete Malpighi wird die an der Oberfläche der Paravaccine befindliche Schuppe entfernt und das nun bloßliegende Rete vorsichtig abgeschabt. Die im Papillarkörper gelegenen, ungemein erweiterten Blutcapillaren dürfen dabei keinesfalls eröffnet werden, nachdem eine selbst geringe Blutbeimengung in der Regel den mikroskopischen Nachweis der „Elementarkörperchen“ vereitelt. Die Ausstrichpräparate werden an der Luft getrocknet, nach dem Vorgange *Paschens* für 10—15 Minuten in destilliertes Wasser eingelegt, in senkrechter Lage getrocknet, in Alcohol absolutus fixiert und nach *Löffler* gefärbt.

Für die genaue Darstellung einer Reihe von Einzelheiten des histologischen Bildes haben sich beim mikroskopischen Studium der Paravaccine bestimmte Fixations- und Färbemethoden von besonderem Vorteil erwiesen. Für die Darstellung der „Zelleinschlüsse“ wird in Formalin fixiert und mit Hämalaun-Eosin gefärbt, die Zellveränderungen im Corium lassen sich am besten durch Fixation in *Zenkerscher* Flüssigkeit oder in Sublimataalkohol mit der *Giemsa*-Färbung nachweisen.

Die „Kerneinschlüsse“ färbt man entweder nach der oben angegebenen Methode oder mit *Giemsa* nach Alkoholfixation. Für ihre rasche Darstellung im Gewebe hat sich mir öfters auch folgende Methode bewährt:

1. Fixation in Alcohol, Paraffineinbettung;
2. färben 5 Minuten in konzentrierter *Giemsa*-Lösung;
3. abspülen in Aqua destill. und differenzieren in $\frac{1}{2}\%$ iger wässriger Tanninlösung, bis die Schnitte einen rötlichen Farbenton annehmen;
4. Aqua destill., rasch Alcohol absolutus, Xylol, einschließen in Zedernöl.

Das Paravaccinevirus scheint nach den bisherigen Versuchen auf die Kaninchencornea nicht übertragbar zu sein.

Verruca vulgaris.

G. Sangiorgi (Zbl. f. Bakt. 1915, LXXVI, „Über einen Befund in der Warze“) beschreibt acidophile Einschlüsse in den Zellen des Stratum granulosum und in den oberen Zellagen der Stachelschicht. Die Körperchen sind 2—7 μ groß und liegen ausschließlich im Protoplasma. Mikrochemisch verhalten sie sich wie Keratin. Fixation in

*Schaudinn*scher Flüssigkeit, Färbung mit Hämatoxylin-Eosin, nach *Mann*, *Giemsa*, *Pappenheim* und *Stutzer*. Die Befunde von *Sangiorgi* konnte ich nicht bestätigen; nach meinen nicht abgeschlossenen Untersuchungen fehlen protoplasmatische Einschlüsse gänzlich, hingegen finden sich in einem Teil der untersuchten Warzen wohl ausgebildete große Kerneinschlüsse in den obersten Zellagen der Stachelschicht. Technik: Zenkerfixation, Färbung nach *Giemsa* oder Hämalaun-Eosin.

2. Dermotrope Vira.

Vaccine-Variola (*Chlamydozoon variolo-vaccinae* v. *Prowazek*).

Die „Elementarkörperchen“ der Vaccine und Variola sind im nativen Präparat und bei Dunkelfeldbeleuchtung nachweisbar. *Volpino* verwendet für die native Untersuchung die Epithelzellen der geimpften Cornea. Intravital lassen sich die Elementarkörperchen der Variola weder mit Neutralrot noch mit Brillantkresylblau darstellen (v. *Prowazek*). Fixierte Deckglaspräparate werden mit *Löffler*s Geißelmethode oder nach *Giemsa* gefärbt (*Paschen*, v. *Prowazek*, *Volpino*, *Casagrandi*). Als Ausgangsmaterial dient entweder die glycerinfreie Vaccinelympe, die jedoch nach *Paschen* vorerst stark (etwa 1000fach) verdünnt werden muß oder der Pustelinhalt bei Variola oder die vaccinierte bzw. variolierte Kaninchencornea. Von letzterer werden nach *Paschen* am besten Klatschpräparate angefertigt, die nach dem Lufttrocknen ins Wasser gelegt werden, um ihnen die noch anhaftenden Serumreste zu entziehen, dann werden sie in senkrechter Lage getrocknet, in absolutem Alkohol fixiert und nach *Löffler* gefärbt. Oder man osmiert nach *Paschen* die leeren Objektträger durch zwei Minuten vor und nach dem Abklatschen, die beschickten Objektträger eine halbe Minute und schließt sofortige *Giemsa*-Färbung an.

Die Variolaelementarkörperchen sind auch mit *Ziehlschem* Fuchsin und mit Thionin, hingegen nicht nach *Gram* färbbar.

Die *Giemsa*-Färbung wird von v. *Prowazek* mit folgender Modifikation empfohlen: Fixierung der Ausstriche mit heißem Sublimatalkohol (nach *Schaudinn*). Wasser, Jodalkohol. Wasser, *Giemsa*-Färbung durch 24 Stunden, differenzieren in 60% igem Aceton, Aceton pur., Xylol. Zedernöl.

In derart nach *Giemsa* „feucht“ gefärbten Präparaten der Hornhaut sind neben den Elementarkörperchen auch die v. *Prowazek*schen „Initialformen“ nachzuweisen. Letztere färben sich auch mit Eisenhämatoxylin (schwarz), mit Safranin (rot), mit Dahlia- und Gentianaviolett (violett) (v. *Prowazek*).

Zur histologischen Darstellung der *Guarnier*schen Körper in der geimpften Hornhaut (zwei- oder dreimal 24 Stunden nach der Impfung) wird das Auge enucleiert und in verschiedener Weise (für

genauere Untersuchungen in Sublimatalkohol, in *Flemmingscher* oder *Hermannscher* Flüssigkeit) fixiert. Nach Paraffineinbettung werden die Schnitte am besten senkrecht zur Verletzung geführt. Gefärbt wird nach *Giemsa*, *Heidenhain*, Hämatoxylin-Eosin, *van Gieson*, *Biondi*, *Mallory* u. s. w.

Paul empfiehlt folgende Technik der histologischen Untersuchung der *Guarnierischen* Körper, die nach den Erfahrungen des Referenten sehr brauchbare Bilder gibt (Schnellverfahren nach *Paul*):

1. 48 Stunden nach der Impfung wird der Bulbus enucleiert und auf höchstens 10 Minuten in alkoholische Sublimatlösung eingelegt (4 g Sublimat, 30 g Alkohol 98⁰/₁₀ig, 60 Aqua destill.):

2. abkappen der Cornea und einbringen derselben auf 1 Minute in 98⁰/₁₀; 1 Minute in Jodalkohol von dunkler Tokayer Farbe:

3. 1 Minute in 98⁰/₁₀;

4. 1 Minute in Alkohol + Chloroform aa.;

5. 1 Minute in Chloroform:

6. 1 Minute in eine gesättigte Lösung von hartem Paraffin in Chloroform von 40°:

7. 1 Minute in verflüssigtes hartes Paraffin bei 60°. Einbetten der Cornea mit der konvexen Cornealfläche nach unten: nach vollständiger Erhärtung der Paraffinscheibe Halbierung derselben mittels eines schmalrückigen scharfen Messers (sägende Messerführung!), um beim Mikrotomieren mit der Schnittführung von der Mitte der halbierten Cornea beginnen und so die infizierten Partien (die Impfritzer) schon in die ersten Schnittserien bekommen zu können. Färbung der Schnitte mit Hämalaun durch 5 Minuten.

Für die *Schnelldiagnose* der *Guarnierischen* Körper schabt man Epithel der geimpften Hornhaut ab und untersucht in einem Tropfen Kammerwasser bei starker Abblendung; der Zusatz von etwas Methylgrünessigsäure oder einfacher Essigsäure (*v. Wasielewski*) läßt ebenfalls die Zelleinschlüsse sehr deutlich hervortreten.

Ungermann und *Zuelzer* verwenden mit besonderem Erfolg die Frischfärbung der *Guarnierischen* Körperchen. Kleine abgeschabte Epithelfetzen der Impfstelle der Kaninchencornea werden unter der Präparierlupe mit feinen Präpariernadeln zu möglichst kleinen Gewebsetzchen verarbeitet und glatt ausgebreitet. Färbung durch etwa 30 Minuten mit einer größeren Menge der Farbflüssigkeit und in einer feuchten Kammer. Am besten haben sich frisch hergestellte Gemische von 1 cm³ 1%iger wässriger Methylenblaulösung mit 6 cm³ physiologischer Kochsalzlösung, oder eine Mischung von 1.5 cm³ einer 1.4%igen Brillantecht-Kresylblaulösung und 5 cm³ physiologischer Kochsalzlösung bewährt. Nach Bedecken des in der Farblösung befindlichen Präparates mit dem Deckglas, wird schließlich das ganze Präparat mit Vaseline umrandet.

Für das Studium der genaueren Struktur der *Guarnierischen* Körper benutzt man mit Vorteil nach *Ewings* Methode angefertigte Klatschpräparate, die nach *Giemsas* feuchter Methode behandelt werden. In derartigen Präparaten sind neben Virusstadien (Elementar- und Initialformen) auch die ersten Anfänge der *Guarnierischen* Körper zu verfolgen (*v. Prowazek*).

Die *Guarnierischen* Körper der Variola sind mit den meisten histologischen Arbeitsmethoden darstellbar. Zum Nachweis der Elementarkörperchen im Pockenschnitt fixiert man am besten in Sublimatalkohol, färbt 6—12 Stunden nach *Giemsa*, wäscht die Schnitte in destilliertem Wasser aus, dann rasch 60%iges Aceton, Aceton pur., Xylol und in Zedernöl einschließen (*v. Prowazek*). Mir ist jedoch dieses Verfahren bisher in keinem Falle gelungen. *Paschen* verwendet die Silberimprägnationsmethode nach *Levaditi* für den Nachweis der Vaccineelementarkörperchen in der Kalbspustel und in der geimpften Kaninchencornea. Schnitte von Variola innerer Organe färben *Mayer* und *Keysseltz* nach dem Verfahren von *Borrel* (Beiheft z. Arch. f. Schiffs- und Tropenkrankheiten 1909).

Nach eigenen sehr ausgedehnten Untersuchungen stellt die Hämalaun-Eosin-Färbung das einfachste und beste Verfahren für den tinktoriellen histologischen Nachweis der *Guarnierischen* Körper dar. Letztere erscheinen rot gefärbt und lassen sich daher mühelos von Kernen und Kernfragmenten trennen. Für Studien über die Struktur der *Guarnierischen* Körper empfiehlt *Hesse* (Berl. klin. Woch. 1919, S. 1035) eine komplizierte Färbung mit Malachitgrün, die es ermöglichen soll, die *Guarnierischen* Körper völlig aufgelöst in einzelne feinste Körnchen darzustellen.

Die Diagnose auf Grund des Hornhautversuches darf sich nach Ansicht des Referenten keinesfalls mit dem makroskopischen Verhalten der Cornea begnügen, sondern muß unbedingt von der mikroskopischen Untersuchung auf Zelleinschlüsse gefolgt sein. Beim Auftreten ganz einzelner Einschlüsse soll man lieber auf die Diagnose verzichten.

In den zellfreien (*Berkefeld*) Filtraten können die Elementarkörperchen nach vorausgegangener Anreicherung auf Kolloidfiltern nachgewiesen werden (*v. Prowazek* und *Aragao*). Das Verfahren wird folgendermaßen beschrieben: „Ein mit physiologischer Kochsalzlösung benetzter Filtrierpapiertrichter wird mit Hilfe eines Platinkonus in einem kleinen Glastrichter dicht durch Ansaugen mit einer Wasserstrahlpumpe eingefügt, dann 3—4mal mit verflüssigtem Agar (3%) derart durchtränkt, daß die Substanz überall den Papierkonus überdeckt und an der Basis einen kleinen Agarschichtkegel bildet. Der Agar muß den Papiertrichter gleichmäßig durchtränken und Lücken los bedecken.“ Der bei der Filtration auf dem Agarfilter restierende Belag wird mit der Platinöse zu Ausstrichen verarbeitet; diese werden an der Luft getrocknet, dann für 10 Minuten in Wasser eingelegt.

hierauf in absolutem Alkohol fixiert und nach *Löffler* oder *Giemsa* gefärbt.

Die Züchtung des Vaccine- und Variolavirus ist trotz aller gemachten Anstrengungen (*Pröscher*, *Licheri*, *Casagrandi*, *Fornet*) bisher nicht gelungen und mikroskopische Präparate des Virus aus angeblichen Reinkulturen sind daher mit größter Vorsicht zu beurteilen.

Varicellen.

Tyzzer beschreibt in den Kernen der Stachelzellen auftretende Einschlußgebilde, die sich auch nach den Erfahrungen des Referenten regelmäßig und leicht darstellen lassen. Technik: Fixation in Sublimatalkohol, *Giemsa*-Färbung. In Ausstrichen hat *Aragao* nach *Löffler* färbbare Elementarkörperchen nachgewiesen. Der *Paulsche* Cornealversuch soll nach *Gins* negativ ausfallen.

Zelleinschlüsse bei Varicellen werden ferner von *Bertarelli* und *Swellingrebel* bei Impfung der Kaninchenhornhaut und von *Keysselitz* und *Mayer* im Epithel der Windpockenpustel beschrieben. Am genauesten hat *Gins* die Windpockenzelleinschlüsse in der Kaninchenhornhaut studiert; sie zeichnen sich durch beträchtliche Größe aus, liegen im Protoplasma und sollen sich auch tinktoriell von den *Guarnierischen* Körpern unterscheiden, da sie Affinität zum Eosin zeigen und keine Kernfärbung geben. Nach Untersuchungen des Referenten ist dieses Merkmal aber nicht stichhältig, da auch die Zelleinschlüsse der Vaccine-Variola eosinaffin sind. Die Abbildungen von *Gins* erinnern übrigens an Phagocytose von degenerierenden Elementen.

Geflügelpocke (*Strongyloplasma avium Lipschütz*).

Das gewucherte Epithel und namentlich die durch seitlichen Druck leicht ausdrückbaren Follikelpfröpfe stellen ein vorzügliches Material für mikroskopische Untersuchungen dar. Die native Untersuchung der Strongyloplasmen ist leicht ausführbar. Für die Färbung verwendet man *Löfflers* Beizmethode und die prolongierte *Giemsa*-Färbung, nach der sie sich jedoch etwas schwieriger färben. Die Untersuchung erfolgt entweder in mit der Emulsion des Gewebes angefertigten Ausstrichpräparaten oder in Klatschpräparaten. Letztere werden nach *v. Betegh* von der mit einem scharfen Rasiermesser parallel mit der Oberfläche der Pocke erzeugten Schnittfläche hergestellt.

Die *Giemsa*-Färbung führt *v. Betegh* folgendermaßen aus: Die eben lufttrockenen Deckgläschen werden mit der Schichtseite nach unten auf die Farblösung gegeben, die sich in einem Blockschälchen mit konkavem Boden befindet und aus 4—5 Tropfen *Giemsa*-Lösung und 10 Tropfen Methylalkohol besteht. Nach zwei Minuten setzt man zu der Verdünnung 5 cm³ schwach alkalischen destillierten Wassers zu und mischt die Lösung durch Bewegen des Gläschens so lange, bis dieselbe

ganz homogen wird. Färbedauer eine Stunde bei Zimmertemperatur; nachher abwaschen mit Wasser und differenzieren in 20 cm³ Wasser, dem 1—2 Tropfen einer 20%igen Tanninlösung zugesetzt werden, dann Wasser, trocknen, einschließen.

Für den Nachweis des Virus im Schnitt wird nach *da Rocha-Lima* in *Carnoy'scher* Flüssigkeit fixiert und nach *Giemsa* gefärbt.

Die mikroskopische Darstellung der Einschlüsse in den gewucherten Epithelzellen gelingt sehr leicht mit den gebräuchlichen Färbeverfahren: sie geben Fettreaktion bei Osmium- und Sudanbehandlung.

Die Züchtung des Taubenpockenvirus ist bisher nicht gelungen, hingegen beschreiben *Bordet* und *Fally* (Ann. de l'Inst. Past. 1910) Reinkulturen des Geflügeldiphtherievirus, das wir in Übereinstimmung mit *Uhlenhuth*, *Carnwath*, *v. Betegh* u. a. mit dem Erreger der Geflügelpocke identifizieren. Es seien daher die genauen Angaben *Bordet* und *Fallys* wiedergegeben.

Als Ausgangsmaterial für die Züchtung muß ein nahezu bakterienfreies Produkt dienen. Man stellt daher in physiologischer Kochsalzlösung eine kleine Aufschwemmung der Beläge (der Geflügeldiphtherie) her und trinkt damit einen Seidenfaden, den man mit einer Nadel durch die Nictitans des Huhnes durchführt. Nach 24 Stunden wird der Faden entfernt, die traumatische Läsion heilt rasch ab, einige Tage später schwillt die Inokulationsstelle an und die benachbarten Gewebe werden ödematös, wobei sich auch Conjunctivitis mit eitrigem Exsudat einstellt. Diese Gewebsveränderungen sind relativ bakterienfrei und für die Kultur geeignet. Resektion der Nictitans, gründliches Waschen in steriler physiologischer Kochsalzlösung und Bereitung einer stark verdünnten Emulsion, mit der das unten zu erwähnende Nährmedium beschickt wird. Züchtung durch 2 Tage bei 35°. Das Wachstum erfolgt unsichtbar, es kommt nur zur leichten Schwärzung der Impfstelle auf dem bluthältigen Nährboden. Impft man jedoch mit dem Platindraht von der Oberfläche ab, so gelingt es typische mikroskopische Präparate herzustellen und weitere Kulturgenerationen zu erhalten. Die Kultur gelingt auch mit den Tränen des kranken Auges. Die Ausstriche werden mit Toluidinblau und besser nach *Giemsa* gefärbt (Alkoholfixation, 5 Tropfen *Giemsa*-Lösung auf 20 Tropfen dest. Wasser, $\frac{1}{2}$ bis $\frac{3}{4}$ Stunden färben bei Zimmertemperatur, waschen, trocknen).

Als Nährboden dient das von *Bordet* und *Gengou* für die Züchtung des Keuchhustenmikroben empfohlene Medium (Ann. de l'Inst. Past. 1906, XX), das folgendermaßen hergestellt wird: 200 cm³ 4%iges Glycerinwasser werden mit 100 g zerkleinerten Kartoffelstücken versetzt und im Autoklaven gekocht. 50 cm³ dieses Extraktes werden mit 150 cm³ physiologischer Kochsalzlösung und mit 5 g Agar versetzt, im Autoklaven gekocht und vor dem Erkalten in Röhren verfüllt (2 bis 3 cm³ per Röhren). Nach erfolgter Sterilisierung werden die Röhren mit gleichen Mengen defibrinierten Blutes (Kaninchen oder Mensch)

gemischt und schief erstarren gelassen. Die Impfung erfolgt auf der Oberfläche der Röhren.

Schafpocke.

In verdünnten Ausstrichen von Ovine (Pustelinhalt) gelingt es mit *Löfflers* Beizmethode oder nach *Giemsa* die Elementarkörperchen nachzuweisen. Sie färben sich schwach mit *Giemsa* und nehmen die gewöhnlichen Färbungen sehr schwer an. Für die Darstellung der „Schafpockenkörper“ (in den „cellules claveleuses“ von *Borrel*) empfiehlt *Paschen* Klatschpräparate anzufertigen, die vorher und nachher osmiert, dann mit *Giemsa* gefärbt werden. *Borrel* fixiert feucht in seinem Gemisch und färbt mit Magentarot oder nach *Laveran*. Schnittmaterial behandelt *Borrel* ebenfalls nach der von ihm angegebenen Färbemethode (s. Allgemeiner Teil).

Alastrim.

Im Pusteleiter findet man selten Streptokokken, Staphylokokken sowie einen kleinen grampositiven Bacillus. Die oft in bedeutender Zahl vorkommenden Elementarkörperchen (*Aragao*) sind im nativen Präparat als kleine glänzende Körperchen mit intensiver *Brownscher* Molekularbewegung zu sehen. Sie färben sich gut mit *Löfflers* Geißelbeize; nach *Giemsa* und mit gewöhnlichen Farbstoffen behandelt, nehmen sie die Farbe schwer an. Sowohl in den Pustelschnitten als auch in der mit Alastrimeiter geimpften Kaninchencornea sind *Guarnierische* Körper nach der für sie oben angegebenen Untersuchungstechnik meist in geringer Zahl zu finden.

Maul- und Klauenseuche.

v. Betegh beschreibt in der Aphthenlymphe bei Dunkelfeldbeleuchtung und in nach *Giemsa* gefärbten Ausstrichpräparaten kleinste Körperchen, die er als Erreger der Maul- und Klauenseuche ansieht. In den Zungenblasen kranker Ferkel fand *Huntemüller* bei Fixation in Sublimatalkohol oder Flemming und Färbung nach *Giemsa* oder *Heidenhain* einschlußartige Gebilde, denen er jedoch keine spezifische Bedeutung beilegt. Zu den gleichen Schlußfolgerungen gelangte vor kurzem *Kallert*, der auch die *v. Beteghschen* Erregerbefunde ablehnt. Auf Grund zahlreicher Untersuchungen an einem sehr verschiedenartigen Material stimme ich dem bei und verweise darauf, daß ich vor *v. Betegh* in jedem serösen Blaseninhalt nach *Giemsa* färbbare kleine, in enormen Mengen vorkommende granulaartige leblose Körperchen unter der Bezeichnung Cystokonien beschrieben habe. Mit den von mir und anderen Autoren beim Molluscum, Vaccine-Variola, Schafpocke u. s. w. gefundenen Strongyloplasmen sind jedoch die Cystokonien — und als solche müssen wir die *v. Beteghschen* Befunde deuten — nicht zu verwechseln, da für die mikroskopische Diagnose der Strongyloplasmen nicht allein die Untersuchung bei Dunkelfeldbeleuchtung und in *Giemsa*-

Präparaten, sondern noch eine Reihe anderer, oben bereits erwähnter Merkmale maßgebend sind.

Krankheiten der Herpesgruppe (Herpes zoster, Herpes genitalis, Herpes febrilis).

Für die Darstellung im Schnitt der von Lipschütz bei den Krankheiten der Herpesgruppe beschriebenen intranucleären Einschlüsse (Karyoöikongruppe der Chlamydozoa) — „Zosterkörperchen“ und „Herpeskörperchen“ („ α -Körperchen“ bei Herpes febrilis und „ β -Körperchen“ bei Herpes genitalis) — verwendet man Fixation in Sublimatalkohol, Carnoy oder Zenker und färbt mit Hämalun-Eosin, Giemsa oder Heidenhain. Die gleiche Technik dient zum Nachweis der Kerneinschlüsse in der mit Herpesmaterial geimpften Kaninchenhornhaut. Das zeitliche Optimum für den Nachweis der „Zosterkörperchen“ in der Impfkeratitis des Kaninchens ist der vierte Tag nach der Impfung; für die „ α -Körperchen“ beträgt dieses Optimum acht Stunden; für die „ β -Körperchen“ drei Tage nach der Impfung. Im nativen Präparat sind die Kerneinschlüsse leicht nachzuweisen; es empfiehlt sich nach Rusch die Untersuchung des Zellmaterials in 40%iger Kalilauge vorzunehmen.

3. Neurotrope Vira.

Lyssa („Negrische Körperchen“).

Der Nachweis der für Lyssa charakteristischen Reaktionsprodukte des Virus, der sog. Negrischen Körperchen, erfolgt in der Regel im Schnitt. Für den Geübteren empfiehlt Negri, die native Untersuchung durch Zerzupfen eines kleinen Stückchens des Ammonshornes in stark verdünnter Essigsäure vorzunehmen, wobei man sich jedoch vor Verwechslung mit anderen Zellbestandteilen, mit Zellkernen, Myelintropfen u. dgl. hüten muß. Die für die Darstellung der Negrischen Körperchen angegebenen histologischen Färbemethoden sind verschieden, je nach dem verfolgten Zweck, indem das eine Mal ein rascher Nachweis im Gewebe zu diagnostischen Zwecken beabsichtigt wird, das andere Mal das Studium der feineren Struktur der Einschlußgebilde in Betracht kommt.

Mit den gewöhnlichen Färbemethoden (Hämatoxylin-Eosin, Biondi, Hämatoxylin-Safranin nach Foà u. s. w.) gelingt es zwar auch, die Negrischen Körperchen nachzuweisen; zur besseren Sichtbarmachung werden jedoch bestimmte Verfahren bevorzugt.

Negri empfiehlt namentlich die Methylenblau-Eosin-Färbung nach Mann: Fixierung in Zenker, Färbung in Mannscher Lösung (1%ige wässerige Eosinlösung 35 cm³, 1%ige wässerige Methylenblaulösung 35 cm³, Aq. destill. 100 cm³) durch 24 Stunden, dann abspülen in Wasser, Alcohol absolutus, Alcohol absolutus + Natronlauge (5 Tropfen einer 1%igen Lösung von Natronlauge in Alcohol absolutus

auf 30 cm³ Alcohol absolutus), Alcohol absolutus, Wasser mit Essigsäure leicht angesäuertes Wasser, schnelles Entwässern, einschließen.

Zur schnellen Diagnose der *Negrishen* Körperchen benutzt *Bohne* das Schnelleinbettungsverfahren mittels Aceton und Paraffin nach *Henke* und *Zeller* (s. *Joannovics*, dieses Handbuch) und färbt nach *Mann* folgendermaßen: $\frac{1}{2}$ —4 Minuten in *Mannscher* Lösung, Wasser, Alcohol absolutus, alkalischer Alcohol absolutus (wie oben) 15—20 Sekunden, abspülen in Alcohol absolutus, Wasser 1 Minute, leicht mit Essigsäure angesäuertes Wasser 2 Minuten, rasch Alkoholreihen und einschließen.

Eine sehr distinkte Färbung liefert die Methode von *Lentz*, mit der auch eine Schnelldiagnose der Körperchen erzielt werden kann.

Lentz benutzt folgende Lösungen: I. Eosin extra B Höchst 0·5 g, 60%iger Äthylalkohol 100·0 g; II. *Löfflersches* Methylenblau gesättigte alkoholische Lösung von Methylenblau B. Patent Höchst, 30 g auf 0·01%ige Kalilauge 100 g).

Als Differenzierungsmittel dienen: I. alkalischer Alkohol: Alcohol absolut. 30·0, 1%ige Lösung von Natr. caust. in Alc. absol. 5 Tropfen; II. saurer Alkohol: Alcohol absolut. 30·0, 50%ige Essigsäure, 1 Tropfen.

Zur Färbung werden Ausstriche wie Schnitte aus dem absoluten Alkohol unmittelbar in die alkoholische Eosinlösung übertragen:

Färbung A:

1. Färben in der Eosinlösung 1 Minute;
2. Wasser:
3. färben in der Methylenblaulösung 1 Minute;
4. Wasser:
5. abtrocknen durch vorsichtiges Aufdrücken auf Fließpapier;
6. differenzieren in alkalischem Alkohol, bis das Präparat nur noch schwache Eosinfärbung erkennen läßt;
7. differenzieren in saurem Alkohol, bis bei Schnitten die Ganglienzellenzüge des Ammonshornes noch eben als schwach blaugefärbte Linien zu sehen sind oder bei Ausstrichen an den dünneren Stellen alles Blau verschwunden ist;

8. Alcohol absolutus, Xylol, einschließen.

Färbung B:

- 1—4 wie oben.
5. Beizen mit *Lugolscher* Lösung (Jod 1·0, Kali jodat. 2·0, Aq. dest. 300·0);
6. Wasser;
7. differenzieren in Methylalkohol, bis kein Blau mehr sichtbar und das Präparat ganz rot ist;
8. Wasser, nachfärben in der Methylenblaulösung $\frac{1}{2}$ Minute;
9. Wasser, dann wie bei Färbung A differenzieren in alkalischem und nachher in saurem Alkohol, dann Alcohol absolutus, Xylol und einschließen.

Bei Färbung *B* treten die „Innenkörperchen“ stärker hervor.

Eine brauchbare und einfache Methode für die Färbung der *Negrishen* Körperchen hat *Stutzer* angegeben:

1. 5—15 Minuten mit *Löfflers* Methylenblau färben, das mit destilliertem Wasser bis zur Durchsichtigkeit im Probierglas gelöst worden ist;

2. differenzieren je nach der Dicke der Schnitte 1—5 Minuten in 1%iger Tanninlösung unter Kontrolle des Mikroskopes;

3. Wasser, mit Löschpapier abtrocknen, rasch Alcohol absolutus, Xylol, Kanadabalsam.

Die feinere Struktur der *Negrishen* Körperchen studierte *Volpino*, wobei er folgendes Verfahren benutzte: färben mit Pikrocarmin 24 Stunden, abspülen mit Wasser, dann färben mit verdünnter Methylenblaulösung bis zur starken Blaufärbung, auswaschen in Wasser und differenzieren in pikrinsaurem Alkohol.

Maresch verwendet die Silberimprägnationsmethode von *Bielschowsky*, mit der er Gefrierschnitte von in 5%iger wässriger Formolösung konserviertem Material behandelt: *Babes* und *Josef Koch* benutzen die Methoden von *Ramon y Cajal* bzw. *Heidenhains* Eisenhämatoxylinfärbung zum Studium der in Gefrierschnitten nachweisbaren kokkenartigen Gebilde und staubförmigen Granulationen und *v. Krogh* empfiehlt für diesen Zweck folgendes Verfahren: färben in polychromem Methylenblau 5 Minuten, kurz abspülen und beizen in 2%iger Chromsäurelösung etwa 2—5 Minuten und länger, dann kurz abspülen und differenzieren in 5%iger Gerbsäure, gründlich abspülen, Alkohol, Xylol und einschließen.

Über die gelungene Reinzüchtung des Lyssavirus hat vor kurzem *Noguchi* berichtet: als Nährmedium wird das von ihm für die Kultur der *Spirochaeta pallida* empfohlene Substrat benutzt (Asciteswasser plus tierisches Gewebsfragment, Überschiebung mit Paraffinöl, anaerobe Züchtung); da jedoch die Angaben dieses Forschers von *Volpino* und nachher von *Kraus* keine einwandfreie Bestätigung gefunden haben, dürfte es sich erübrigen, hier über diese noch nicht abgeschlossene Frage zu referieren.

Poliomyelitis.

Bei ihren Untersuchungen über den Erreger der Poliomyelitis gingen *Flexner* und *Noguchi* von der Kultur aus. Stückchen der Hirnrinde oder *Berkefeld*-Filtrate des Virus dienten zur Beschickung des von *Noguchi* empfohlenen Nährbodens (Ascitesflüssigkeit, der ein steriles Gewebsstück zugesetzt wird, Überschiebung mit Paraffinöl oder Züchtung im Anaerobenapparat). Nach 10—12tägigem Aufenthalt im Brutschrank bei 37° traten in den unteren Abschnitten der Röhren flockige Trübungen auf, die, wie die Untersuchung im Dunkelfeld und in *Giensa*- oder *Gram*-Präparaten zeigte, aus kleinen strongyloplasmaähnlichen Körperchen bestanden, die zu Paaren, in kurzen Ketten oder in Haufen lagen.

Auch auf festen Nährböden ist *Flexner* und *Noguchi* die Züchtung gelungen, indem zu dem angeführten Nährmedium 2% Agar zugefügt wurde.

Für die Schnell diagnose empfehlen die Autoren die luft-trockenen Kulturausstriche in der Flamme zu fixieren und mit einigen Tropfen *Giemsa*-Lösung, die mit 20 Tropfen destillierten Wassers verdünnt werden, zu überschütten und über der Flamme vorsichtig bis zur Dampfentwicklung zu erwärmen, dann im Wasser abspülen und trocknen. Besser ist jedoch die langsame *Giemsa*-Färbung: eine Stunde die lufttrockenen Ausstriche in Methylalkohol fixieren, in destilliertem Wasser abwaschen und nach *Giemsa* (1 Tropfen auf 1 cm³ destilliertes Wasser) 2—12 Stunden oder über Nacht färben.

Um die Beziehungen des Virus zum Gewebe des Zentralnervensystems festzustellen, empfehlen *Flexner* und *Noguchi* Klatschpräparate oder Schnitte anzufertigen. Erstere werden mit der Schicht nach unten in einem frisch bereiteten Gemisch von 1 Teil *Giemsa*-Lösung und 2 Teilen Methylalkohol fixiert. Dann werden 20 Teile einer Kalilauge 1 : 10.000 zu dem Gemisch gegossen, nach 2 Stunden wird das Deckglas mit Wasser abgespült und in einer Tanninlösung, die durch Zusatz von 1—2 Tropfen einer 20%igen Lösung zu 40 cm³ Wasser hergestellt wird, vorsichtig einige Sekunden differenziert, dann 2 Minuten in Wasser gewaschen, getrocknet und in Zedernöl eingeschlossen.

Für Schnittmaterial wird die Fixation in Zenker oder Sublimatalkohol empfohlen. Die Schnitte, die mit *Lugolscher* Lösung und nachher mit $\frac{1}{2}$ %iger Natriumthiosulfatlösung (wie bei der feuchten *Giemsa*-Färbung) behandelt werden, werden in Wasser ausgewaschen und passieren folgende Reagenzien: 95%igen Alkohol, absoluten Alkohol, Chloroform, Aceton, Benzol, Äther, absoluten Alkohol, 95%igen Alkohol, destilliertes Wasser. In jedem dieser Reagenzien verbleiben die Schnitte je eine Stunde, hierauf färben durch 24 Stunden in einer *Giemsa*-Lösung, bestehend aus 3 Teilen *Giemsa* und 45 Teilen Wasser; dann kurz Aq. destill., Aceton, Acetonxylol, Xylol, einbetten in Zedernöl.

Um die Schwierigkeit des histologischen Nachweises der im Gewebe nur spärlich vorkommenden Erreger zu verringern, empfiehlt *Amoss*, eine Anreicherung des Virus in den Gewebstückchen durch eine etwa 10tägige Bebrütung letzterer im *Noguchischen* Nährboden vorzunehmen. Nach Fixation der Gewebsfragmente in Pyridinlucidol (nach *Szécsi*), Einbettung in Paraffin; die sehr dünnen Schnitte werden nach der oben angeführten Modifikation der *Giemsa*-Färbung von *Noguchi* gefärbt.

G e f l ü g e l p e s t .

Für den Nachweis der „Hühnerpestkörperchen“ in Gehirnschnitten von Gänsen werden die gewöhnlichen Methoden (Hämalaun-Eosin, Methylenblau u. s. w.) benutzt. Um besonders distinkte Bilder zu er-

halten, empfiehlt *Schiffmann* ein Methylgrün-Pyronin-Gemisch, bestehend aus 1 g Pyronin, 1 g Methylgrün und 100 cm³ Leitungswasser. Die Lösung wird nicht filtriert. *Kleine* verwendet die *Mannsche* Färbung für die Darstellung der Einschlüsse.

Kleinste stronglyoplasmaähnliche Körperchen hat *v. Prowazek* mit der *Löfflerschen* Geißelbeize in stark zentrifugierten klaren Filtraten aus Gehirn-, Blut- und Leberbrei beschrieben. Diese Körperchen konnten auch (ähnlich wie bei *Vaccine*) durch Anreicherung der zellfreien Filtrate des Virus auf dem Agarultrafilter von *Giemsa* und *v. Prowazek* festgestellt werden.

Enzootische Gehirn - Rückenmarks - Entzündung (*Bornasche* Krankheit) des Pferdes.

Die von *Joest* in den Kernen der Ganglienzellen, besonders des Ammonshornes gefundenen „Einschlüsse“ lassen sich mit verschiedenen Methoden histologisch darstellen. Man verwendet am besten die Methode von *Lentz*, *Stutzer*, ferner *Heidenhains* Eisenalaun-Hämatoxylin-Färbung oder die *Giemsa*-Färbung.

Hundestaupe.

Die Färbung der „Staupekörperchen“ in Schnitten des Ammonshornes erfolgt mit der Eosin-Methylenblau-Färbung nach *Lentz*, ferner mit den Methoden von *Mann* und *Heidenhain*.

Landry'sche Paralyse.

Leschke beschreibt in Tupf- und Schnittpräparaten des Rückenmarkes eines Falles von *Landry'scher* Paralyse 0.1—0.2 μ große Körperchen, die sich sowohl mit Methylenazur oder *Giemsa* als auch mit Carbofuchsin färbend darstellen lassen. Schnitte werden mit konzentrierter Carbofuchsinlösung etwa eine Minute gefärbt und dann vorsichtig in einer schwach gelben Lösung von Pikrinsäure in absolutem Alkohol unter ständiger mikroskopischer Kontrolle so lange entfärbt, bis alles außer den Zellkernen und den roten Blutkörperchen ungefärbt erscheint. Auch die Kultivierung der als Erreger gedeuteten Körperchen glaubt *Leschke* mit der Methode von *Noguchi* bei der Züchtung des Poliomyelitisvirus festgestellt zu haben. (Die Bilder wirken nicht überzeugend!)

Scharlach.

Die Färbung der von *Mallory* in Hautschnitten Scharlachkranker beschriebenen Körperchen erfolgt mit Methylenblau oder (nach *v. Prowazek*) mit Eosinazur, ferner mit *Ehrlichs* Hämatoxylin mit Azurblauanfärbung.

Zur Darstellung der chlamydozoenähnlichen Einschlüsse in Ausstrich- und Schnittpräparaten von Niere und Mesenterialdrüsen empfiehlt *Bernhardt* feucht in Sublimatalkohol oder in Flemming zu fixieren

und nach *Giemsa* oder *Heidenhain* zu färben. Auch *Höfer* benutzt letztere Färbungsmethode für das Studium der Einschlußgebilde. *Paschen* berichtet, in den Tonsillenabstrichen Scharlachkranker, bevor es zur Sekundärinfektion mit Streptokokken kommt, kleinste strongyloplasmaähnliche Körperchen mit der *Löfflerschen* Beizmethode gefunden zu haben.

Verruga peruviana.

Für den Nachweis der Zelleinschlüsse (*Mayer, da Rocha-Lima* und *Werner*) in Zupf- und Klatschpräparaten dient die *Giemsa*-Färbung nach trockener oder feuchter Fixation. Unklare Bilder gibt die *Löfflersche* Geißelfärbung. Im Schnitt lassen sich die chlamydozoenähnlichen Einschlüsse nach *Romanowsky-Giemsa* oder nach *Levaditi* darstellen (*da Rocha-Lima*).

Fleckfieber (*Rickettsia Prowazeki da Rocha-Lima*).

Die von *v. Prowazek* in den polynucleären Leukocyten gefundenen strongyloplasmaähnlichen Körperchen sind mit verschiedenen Methoden darstellbar. Die vitale Färbung gelingt mit Azur II oder nach der Methode von *da Rocha-Lima* bei direktem Zusatz der *Giemsa*-Lösung. In fixierten Blutausrichen färben sie sich nach *Giemsa* oder nach vorausgegangener sorgfältiger Wässerung der Präparate mit *Löfflers* Geißelbeize. Auch die nasse Fixierung der Blutausriche mit *Schaudinn's* Sublimatalkohol und Färbung mit *Heidenhain's* Eisenhämatoxylin und ferner die nasse Acetonmethode von *Giemsa* wird zur Färbung der Körperchen empfohlen.

Ob diese *Prowazekschen* Körperchen die Krankheitserreger des Fleckfiebers sind, kann derzeit nicht überzeugend bewiesen werden, ebensowenig aber auch das Gegenteil, d. h. der Beweis, daß die *Prowazekschen* Körperchen weiter nichts sind als Granulationen, ist ebenso schwer zu liefern (*da Rocha-Lima*). Möglicherweise sind sie mit den in den Epithelzellen des Magendarmkanales der Läuse Fleckfieberkranker parasitierenden Mikroben, den von *da Rocha-Lima* entdeckten *Rickettsien* (*Rickettsia Prowazeki*) zu identifizieren. Letztere wachsen nicht auf gewöhnlichen Bakteriennährböden und werden selbst von den durchlässigsten Bakterienfiltern zurückgehalten, sollen aber der Vollständigkeit halber ihrer Wichtigkeit wegen hier kurze Besprechung finden.

Ob die *Rickettsia Prowazeki* zu den Bakterien oder zu den Chlamydozoen-Strongyloplasmen gehört, kann einstweilen noch nicht entschieden werden (*da Rocha-Lima*). Die *Rickettsien* färben sich sehr schlecht mit den gewöhnlichen Bakterienfärbungen, nach *Giemsa* nehmen sie einen roten, dem Chromatinrot ähnlichen Farbenton an; sie sind gramnegativ. Von allergrößter Wichtigkeit und entscheidend für die Diagnose der *Rickettsia Prowazeki* ist ausschließlich ihr

histologischer Nachweis, nämlich der Nachweis ihres Vorkommens innerhalb der Epithelzellen des Magendarmkanales, in denen sie, neben dem Kern gelegen, an Chlamydozoen erinnernde Zelleinschlüsse bilden.

Über die Technik des Einbettens und Schneidens der Laus hat in letzter Zeit namentlich *H. Sikora* (Beiträge zur Anatomie, Physiologie und Biologie der Kleiderlaus, I. Anatomie des Verdauungstraktes. in Beiheften zum Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene 1916, XX) genaue Angaben gemacht. Man fixiert am besten im *van Leeuwen*-Gemisch (12 Teile 1%ige Pikrinsäurelösung in Alcohol absolutus, 2 Teile Chloroform, 2 Teile Formol, 1 Teil Essigsäure) oder in reiner konzentrierter Pikrinsäure und 1% Chromsäure, ferner in Flemming, Perennyi oder 4%iger Ameisensäure. Eingebettet wird nach der Methode *Apathys* (Paraffin-Zelloidin-Einbettung) (*Apathy*, Ztschr. f. wissensch. Mikroskopie 1912), die folgendermaßen ausgeführt wird:

Für Schnitte über 10 μ : einbetten in wasserfrei zubereitetem $\frac{1}{2}$ -, 2-, 4%igem Zelloidin, härten in Chloroformdämpfen, dann in Chloroform, einlegen in das 10fache Volumen Ölgemisch (4 Gewichtsteile Chloroform, 1 Carbolkrystalle, 4 Zedernöl, 2 Origanumöl, 1 Alcohol absolutus), dreimal wechseln, dann gründliches Auswaschen in Benzol, 24 Stunden in den Paraffinschrank in oft gewechseltes Paraffin in flachen Schalen.

Zur Abkürzung des Verfahrens dient auch die von *Scholz* für Aceton-Zelloidin-Lösungen angegebene Schnelldurchtränkung im Brutschrank.

Die Färbung der Rikettsien erfolgt nach der feuchten *Giemsa*-Methode, wobei nur das Erzielen sehr guter *Romanowsky*-Färbungen die gewünschten Resultate liefert. Das Differenzieren der gefärbten Schnitte erfolgt unter dem Mikroskop zuerst mit neutralem Acetonxylol, dann mit alkalisiertem Acetonxylol (Acetonxylol 20 cm^3 plus 1 Tropfen 1%iger Natriumcarbonatlösung).

Virus myxomatosum der Kaninchen.

Als Erreger werden in den hypertrophischen Kernen der das myxomatöse Gewebe zusammensetzenden Zellen parasitierende Stron-gyloplasmen beschrieben, die sich mit *Löfflers* Beizmethode darstellen lassen (*de Beaufepaire-Aragao*). Von *Splendore* wurde auch das Vorkommen chlamydozoenähnlicher Einschlüsse in *Giemsa*-Präparaten beschrieben, die aber von *Moses* nicht bestätigt werden konnten.

Peripneumonie der Rinder (*Asterococcus mycoides* *Borrel*).

Die Untersuchung des peripneumonischen Exsudates im nativen (Ultramikroskop!) und gefärbten Präparat führt nach *Dujardin-Beaumez* zu keinerlei einwandfreien Ergebnissen. hingegen ist der Erreger in der Kultur leicht nachzuweisen. Die Züchtung erfolgt nach den klassischen Untersuchungen von *Nocard* und *Roux* (und ihren Mitarbeitern

Borrel, Salimbeni und Dujardin-Beaumetz) entweder mit der Kollodiumsäckchenmethode oder in Serumbouillon bzw. Serum-Pepton-Agar, wobei das von *L. Martin* für die Herstellung des Diphtherietoxins empfohlene Peptonwasser benutzt wird.

Die Kollodiumsäckchen werden mit Nährbouillon gefüllt, mit dem keimhaltigen Material beschickt und dann in die Peritonealhöhle von Tieren versenkt. Die Säckchen können im Autoklaven sterilisiert werden. Die Kollodiummembran ist für Bakterien und zellige Elemente vollkommen undurchgängig, hingegen für flüssige Substanzen sehr leicht passierbar, so daß die löslichen Bakterienprodukte aus dem Säckchen austreten und die Körperflüssigkeit in dasselbe eintreten können, wodurch die Kultur des eingepfchten Keimes begünstigt wird. Die Impfung erfolgt mit *Pasteurscher* Capillarpipette, worauf die Öffnung mit Siegellack geschlossen wird. An Stelle des Kollodiums kann man nach dem Vorschlag von *Metschnikoff* die sehr feine Membran verwenden, welche das Innere des Schilfrohrs (*Phragmites communis*) auskleidet. Nach 3—4wöchigem Aufenthalt im Peritoneum des Kaninchens enthalten die Säckchen eine eiweißhaltige opaleszierende Flüssigkeit, in welcher sich zahlreiche kleine lichtbrechende Körperchen vorfinden, und die bei Impfung von Rindern sich virulent erweist.

Für die Kultur *in vitro* ist ein besonderes Nährsubstrat notwendig; der Erreger der Peripneumonie der Rinder gedeiht nur in einer speziellen Peptonbouillon, der Blutserum zugefügt wird. Die Forscher benutzten das von *L. Martin* für die Herstellung des Diphtherietoxins empfohlene Peptonwasser. Diese Bouillon wird mit Schweinemägen bereitet, die fein zerkleinert, mit angesäuertem auf 50° erwärmten Wasser übergossen werden (200—300 g Schweinemägen + 10 g Acid. hydrochlor. pur. + 100 g Wasser bei 50°, welche Temperatur durch 24 Stunden eingehalten werden muß).

Die abgegossene Flüssigkeit wird in Flaschen verteilt und sterilisiert, dann unter Erwärmung mit Soda alkalisch gemacht. Andererseits stellt man sich Bouillon aus 500 g Rindfleisch und 1000 g Wasser her. Der Abguß wird auf 70—80° erwärmt, und zu gleichen Teilen mit dem alkalisch gemachten Peptonwasser vermischt und dem Ganzen 10% Rinderserum zugefügt. Diese Bouillon wird durch Chamberlandkerzen filtriert, in Röhrchen oder Kölbchen abgefüllt und durch 48 Stunden im Brutschrank auf Sterilität geprüft.

Nach Impfung dieses Nährbodens mit dem virulenten Material kommt es nach 2—3tägigem Aufenthalt bei 37° zum Auftreten einer Opalescenz und die Kultur erweist sich im Experiment virulent.

Um den Erreger auf festen Nährböden zum Wachstum zu bringen, verwendet man Serum-Pepton-Agar unter Benutzung der gleichen Bouillon wie für die Herstellung der flüssigen Nährböden.

Der Serumzusatz erfolgt nach dem Erstarren des Agars, indem man die Röhrchen in horizontale Lage bringt und das eingebrachte Serum

mit der Oberfläche des Agars zwecks genügender Durchtränkung während 24 Stunden in Berührung läßt. Hierauf werden die Röhren auf Sterilität im Brutschrank geprüft. Der Nährboden ist durchsichtig und gestattet die Untersuchung der darauf zum Wachstum gelangten Kolonien mittels Lupe oder bei schwacher Vergrößerung. Die tau-tropfenähnlichen Kolonien sind sehr klein und erreichen später einen Durchmesser von 1 mm.

Bordet verwendet bei seinen Untersuchungen über den Erreger der Peripneumonie der Rinder, den bei der Züchtung des Geflügeldiphtherievirus (s. dieses!) beschriebenen Nährboden. Auch hier erfolgt das Wachstum kaum wahrnehmbar und wird nur durch die schwärzliche Verfärbung des Impfstiches verraten, die durch Reduktion des Hämoglobins bedingt ist.

In den Kulturen lassen sich die Erreger mit basischen Anilinfarbstoffen darstellen. Nach *Gram* färben sie sich nicht. *Borrel* zentrifugiert die Kulturen und verwendet das Sediment zum Streichen von Deckglaspräparaten. Zur Färbung empfiehlt *Borrel* die *Löfflersche* Beizmethode, während *Bordet* sich der *Giemsa-Färbung* bedient.

Gelbsucht der Seidenraupen.

Für ätiologische Untersuchungen über das Virus der Gelbsucht der Seidenraupen ist namentlich von *v. Prowazek* eine genaue Technik ausgearbeitet worden. Native Blutpräparate werden bei Dunkelfeldbeleuchtung untersucht oder man läßt das Material auf dem Deckgläschen antrocknen, montiert letzteres auf Wachsfüßchen und untersucht ohne Einschlußmedium. Die spezifischen Reaktionsprodukte auf das Virus, die sog. *Polyeder*, die im Kern vorkommen und kristallinische Struktur besitzen, färben sich mit Fuchsin, Eosin, Methylgrün u. s. w., vital mit Methylenblau, Neutralrot und Azur II. Auch mit dem *Burrischen* Tuscheverfahren sind sie nachweisbar.

Für intravitale Färbungen des virushaltigen Materiales verwendet *v. Prowazek* Azur II, Methylenblau medic., Brillantkresylblau und Neutralrot in 1%iger Lösung. Ausstrichpräparate werden mit heißem Sublimatalkohol fixiert und mit *Böhmers* Hämatoxylin, *Heidenhains* Eisenhämatoxylin, *Giemsas* Eosinazur, ferner nach *Gram*, *Borrel* und *Mallory* gefärbt. Für Schnittmaterial wird Sublimatalkoholfixierung empfohlen; gefärbt wird nach *Giemsa*, *Borrel*, *Heidenhain* oder nach der älteren Methode *Levaditis*.

Literatur: *Amoss Harold L.*, A note on the etiology of epidemic poliomyelitis. J. of exper. med. 1914, XIX. — *Babes*, Untersuchungen über die Negrischen Körper und ihre Beziehung zu dem Virus der Wutkrankheit. Zt. f. Hyg. u. Inf. 1907, LVI. — *de Beaurepaire-Aragao*, Estudos sobre alastrim. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz 1911; Sobre o microbio do Myxoma dos coelhos. Brazil medico 1912, Nr. 47. — *Benignetti* u. *Gino*, Riv. d'Ig. e San. pub. 1906, XVII. — *Bernhardt*, Experimentelle Untersuchungen über die Scharlachätiologie; I. u. II. Mitteilung. D. med. Woeh. 1911, Nr. 17 u. 23. — *Bertarelli*, Zbl. f. Bakt., Abt. I, Orig. L. —

r. *Betegh*, Über die Beziehungen zwischen Geflügelpocken und Geflügeldiphtherie. Zbl. f. Bakt. 1913, Abt. I, Orig. LXVII; Beiträge zur Ätiologie der Maul- und Klauen-seuche. Zbl. f. Bakt. 1911, Abt. I, Orig. LX. — *Bordet*, La morphologie du microbe de la péripneumonie des bovidés; La diphthérie des pigeons. Zbl. f. Bakt. 1913, Abt. I, Orig. LXVII. — *Borrel*, Microbes dits invisibles et surcoloration. Compt. rend. de la soc. de biol. 1909 und 1912; Sur les inclusions de l'épith. cont. des oiseaux. Ebenda 1904; Les épithélioses infectieuses et les épithéliomas. Ann. de l'Inst. Pasteur 1905. — *Borrel*, *Dujardin-Beaumetz*, *Jeanet* et *Jouan*, Le microbe de la péripneumonie. Ann. de l'Inst. Pasteur 1910. — *Casagrandi*, Zur Ätiologie der Menschenpocken. Zbl. f. Bakt., Abt. I, Orig. LVII; Sulla coltabilità del virus vaccinia nei leucociti. Bull. de soc. med. e nat. Cagliari 1910. — *Celli* u. *de Blasi*, Über die Ätiologie der kontagiösen Agalaktie. Zbl. f. Bakt. 1906, Abt. I, Orig. XLI. — *Dujardin-Beaumetz*, Artikel „Peripneumonie“ im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle-Wassermann. 2. Aufl., VIII. — *Ewing*, Comparat. histology of vaccinia and Variola. J. of med. Res. 1904; The structure of vaccinal bodies in isolated cells. Ebenda 1905, XIII. — *Flemming*, Untersuchungen über sog. Trachomkörperchen. A. f. Augenheilk. LXVI. — *Flexner* u. *Noguchi*, Experiments on the cultivation of the microorganism causing epidemic poliomyelitis. J. of exper. med. 1913, XVIII. — *Fornet*, Die Reinkultur des Pockenerregers. W. med. Woch. 1913. — *Giemsa*, Über die Färbung von Feuchtpräparaten mit meiner Azureosinmethode. D. med. Woch. 1909; Über die Färbung von Schnitten mittels Azureosin. Ebenda 1910. — *Giemsa* u. *v. Prowazek*, Weitere Untersuchungen über sog. ultramikroskopische Infektionserreger; Zur Filtration des Hühnerpestvirus. M. med. Woch. 1908, Nr. 29. — *Gins*, Über histologische Veränderungen und bisher unbekannte Zelleinschlüsse in der mit Windpockenpustelinhalt geimpften Kaninchenhornhaut. Zt. f. Hyg., LXXXVI. — *Halberstädter*, Trachom. im Handb. der pathog. Protozoen von v. Prowazek, I, H. 2. — *Halberstädter* u. *v. Prowazek*, Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur bei Trachom. Arb. a. d. kais. Ges. 1907; Zur Ätiologie des Trachoms. Berl. klin. Woch. 1909. — *Hegler* u. *v. Prowazek*, Berl. klin. Woch. 1913, Nr. 44. — *Herzog*, Darstellung der Trachomkörper im Schnittpräparat. D. med. Woch. 1909. — *Höfer*, Über intracelluläre Einschlusskörper bei Scarlatina. D. med. Woch. 1911. — *Huntemüller*, Befunde bei Maul- und Klauen-seuche. Zbl. f. Bakt. 1912, Abt. I, Orig. LXI; Zt. f. Chemother. 1913. — *Joest*, Weitere Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarks-Entzündung (Bornasche Krankheit) des Pferdes. Zt. f. Inf., parasit. Krankh. u. Hyg. d. Haustiere 1911, X. — *Kallert*, Untersuchungen über Maul- und Klauen-seuche; I. u. II. Mitteilung. Arb. a. d. kais. Ges. 1914. — *Kleine*, Neue Beobachtungen zur Hühnerpest. Zt. f. Hyg. u. Infektionskr., LI. — *Koch Josef*, Studien zur Ätiologie der Tollwut. Zt. f. Hyg. u. Infektionskr. 1910, LXVI. — *Kraus R.*, W. klin. Woch. 1914. — *v. Krogh*, zit. bei *J. Koch*, Zt. f. Hyg. LVI. — *Leber*, Untersuchungen über das Virus des Molluscum contagiosum. Zbl. f. Bakt., Abt. I, Orig. LXVII. — *Leber* u. *Hartmann*, Untersuchungen zur Ätiologie des Trachoms. Klin. Jahrb. 1909. — *Lentz*, Ein Beitrag zur Färbung der Negrischen Körper. Zbl. f. Bakt. 1907, Abt. I, Orig. XLIV. — *Leschke*, Über den Erreger der Landry'schen Paralyse. Berl. klin. Woch. 1914, Nr. 17. — *Licheri*, Sulla colorabilità di alcuni corpusc. etz. Ann. d'igiene sperim. 1909; Tentativi per coltivare ... il virus vaccino etz. Ebenda. — *Lindner*, Zur Färbung der Prowazekschen Einschlüsse. Zbl. f. Bakt. 1910, Abt. I, Orig. LV. — *Lipschütz*, W. klin. Woch. 1907; Derm. Zt. 1907; Untersuchungen über Epithelioma contagiosum der Vögel. Zbl. f. Bakt. 1908, Abt. I, Orig. XLVI; Über mikroskopisch sichtbare, filtrierbare Virusarten (über Strongyloplasmen). Ebenda 1908, XLVIII; Artikel „Molluscum contagiosum“ und „Epithelioma contagiosum“ im Handbuch der pathogenen Protozoen von v. Prowazek, I, Heft 2; „Filtrierbare Infektionserreger“ im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle-Wassermann. 2. Aufl., VIII; Über Cystokonien. W. klin. Woch. 1910; Zur Ätiologie der Para-

vaccine. W. klin. Woch. 1918; Zbl. f. Bakt. 1918, Abt. I, Orig.; Untersuchungen über Paravaccine. A. f. Derm. 1919; Wiener klinische Wochenschrift 1920; Wiener medizinische Wochenschr. 1921. — *Mallory*, Scarlet fever. Protozoen-like bodies found in four cases. The Journ. of med. res. X, Nr. 4. — *Maresch*, Über die feinere Struktur der Negrischen Körper. Wr. kl. Woch. 1905, Nr. 25. — *Mayer, da Rocha-Lima* u. *Werner*, Untersuchungen über Verruga peruviana. M. med. Woch. 1913, Nr. 14. — *Negri*, Beitrag zum Studium der Ätiologie der Tollwut. Zt. f. Hyg. 1903 u. 1904; Über die Morphologie und den Entwicklungszyklus der Parasiten der Tollwut. Zt. f. Hyg. 1909. — *Nocard* u. *Roux*, Le microbe de la péri-pneumonie. Ann. de l'Inst. Pasteur 1898. — *Noguchi* u. *Cohen*, Experiments on the cultivation of so called trachoma bodies. J. of exp. med. 1913, XVIII. — *Otto* u. *Neumann*, Studien über Gelbfieber in Brasilien. Zt. f. Hyg. u. Inf. 1905, LI. — *Paschen*, Über den Erreger der Variolavaccine u. s. w. Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung von Kraus und Levaditi, 1910; Was wissen wir über den Vaccineerreger? M. med. Woch. 1906, Nr. 49; Untersuchungen über Variola. M. med. Woch. 1908; Über Schafpocken. Ebenda 1909; Über die Ewingsche Klatschmethode zur Darstellung der Vaccinekörperchen. Ebenda 1909; Zur Ätiologie der Variola und Vaccine. D. med. Woch. 1913. — *Paul G.*, Ätiologische Untersuchungen bei Variola. In Beiträge zur Klinik der Infektionskrankheiten und zur Immunitätsforschung, VII. — *v. Prowazek*, Chlamydozoa. A. f. Protistenkunde 1907, X; Vaccine und Variola im Handbuch der pathogenen Protozoen von v. Prowazek 1911, I, Heft 2; Weitere Untersuchungen über das Vaccinevirus. Zbl. f. Bakt. 1910, Abt. I, Orig. LVI; Untersuchungen über den Erreger der Vaccine. I, II u. III. in den Arb. a. d. kais. Ges. 1905, 1906, 1907; Die Chlamydozoen als intracelluläre „symbiotische“ Krankheitserreger. Erg. d. wissensch. Med. Separatabdruck; Untersuchungen über die Gelbsucht der Seidenraupen. Zbl. f. Bakt. 1913, LXVII. — *v. Prowazek* u. *Beaurepaire*, Untersuchungen über Variola. M. med. Woch. 1908. — *Pröscher*, Über die künstliche Züchtung eines unsichtbaren Mikroorganismus aus der Vaccine. Zbl. f. Bakt., Abt. I, Orig. XL. — *Radziejewski*, Trachomkörperchen im tiefen Gewebsschnitt. Zit. bei Halberstädter. — *Remlinger*, Les microbes filtrants. Bull. de l'Inst. Pasteur 1906. — *da Rocha-Lima*, zit. bei Hegler und v. Prowazek; Verhandlungen der Deutschen Pathologischen Gesellschaft 1913, S. 198; Untersuchungen über Fleckfieber. Münch. mediz. Wochenschrift 1916, Nr. 39; Zur Ätiologie des Fleckfiebers. Zbl. f. allg. Path., Beiheft zu XXVII. — *Rosenthal W.*, Beobachtungen an Hühnerblut mit stärksten Vergrößerungen und mit dem Ultramikroskop. Zbl. f. Bakt., Abt. I, Ref., XXXIX. — *Schiffmann*, Zur Histologie der Hühnerpest. Zbl. f. Bakt., Abt. I, Orig. XL. — *Splendore*, Über das Virus myxomatosa der Kaninchen. Zbl. f. Bakt., Abt. I, Orig. XLVIII. — *Stutzer*, Die einfachste Färbungsmethode des Negrischen Körperchens. Zt. f. Hyg. u. Inf. 1911, LXIX. — *Swellengrebel*, A. f. Hyg. VII. — *Tyzzer*, The Philippine Journal of Science. 1906, Vol. I. — *Uhlenhuth* u. *Böing*, Chlamydozoenbefunde bei Schweinepest. Berl. klin. Woch. 1910, Nr. 32 und Zbl. f. Bakt. 1912, Abt. I, Orig. — *Ungermann* u. *Zuelzer*, Beiträge zur experimentellen Pockendiagnose, zur Histologie des cornealen Impffaktes und zum Nachweis der *Guarnierischen* Körper. Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamt 1920, LII. — *Volpino*, Corpuscoli mobili, specifici dell' infezione vaccinica etc. Riv. d'igien. e di sanità pubblica 1907; Weitere Untersuchungen über die beweglichen Körperchen der Vaccine. Zbl. f. Bakt. 1909, Abt. I, Orig. XLIX. — *v. Wassielewski*, Beiträge zur Kenntnis des Vaccineerregers. Zt. f. Hyg. u. Inf. 1901.

Methoden der Färbung von Mikroorganismen im Schnitt.

Von Prof. Dr. **Georg Joannović**, Belgrad.

Der Nachweis von Bakterien in tierischen Geweben erfolgt entweder an frischen ungehärteten oder an fixierten und gehärteten Objekten. Erstere werden durch Gefrieren schnittfähig gemacht, dabei leidet ihre Struktur, und der Nachweis von Mikroorganismen in ihnen ist keineswegs ein absolut sicherer. Daher empfiehlt es sich, die Untersuchung von Geweben auf Bakterien an fixierten und gehärteten Objekten vorzunehmen und die Gefriermethode nur dann anzuwenden, wenn es sich darum handelt, sich rasch zu orientieren.

Weigert schneidet die Gewebe ohne weitere Einbettung. Er klebt sie mit Mucilag. gumm. arab. (1 Teil Gummi, 2 Teile Wasser) oder mit Glyceringelatine (1 Teil Gelatine, 2 Teile Wasser, 4 Teile Glycerin) auf Korkstückchen auf, die in die Klammer des Mikrotomes eingespannt werden. Die Gewebstückchen werden auf der einen Seite mit dem Klebemittel bestrichen, auf den Kork so lange angedrückt, bis jenes erstarrt ist. Dann kommen die Stücke auf mehrere Stunden in 80%igen Alkohol. Beim Zerlegen der Organstücke in Schnitte sind Messer und Objekt durch 80%igen Alkohol feucht zu erhalten.

Hamilton hat empfohlen, die Gewebstücke in Zuckersirup und dann in dicken Gummischleim einzulegen, aus dem sie geschnitten werden. *Cole* benutzt ein Gemenge beider Flüssigkeiten (Gummi arab. 120 g, Aq. dest. 180 cm³, davon 2 Teile, und Zucker 372.0 g, Wasser 37.0 cm³, 3 Teile).

Diese Methoden sind außerordentlich einfach, haben aber höchstens noch bei dichteren Geweben halbwegs gute Resultate, sind aber bei lockeren Geweben nicht anwendbar. Bei diesen muß eine Durchtränkung der Hohlräume und Lücken mit einer erstarrenden Flüssigkeit erfolgen, was durch die verschiedenen Methoden der Einbettung erreicht wird. Dieser muß eine Fixierung und Härtung der Gewebe vorausgehen.

Die Fixierung hat den Zweck, die Gewebstruktur möglichst unverändert zu erhalten; daher empfiehlt es sich, dieselbe so rasch als möglich vorzunehmen. Durch die Fixierungsflüssigkeiten wird das Eiweiß zur Gerinnung gebracht und dadurch schwer löslich. *Tellyesniczky* fordert von einer guten Fixierungsflüssigkeit, daß sie durch rasche Diffusion schnell in das Gewebe eindringt, die Zellen abtötet und eine langsame Koagulation des Eiweißes herbeiführt, damit nicht zu starke Schrumpfung eintritt. Darum dürfen die Gewebstücke nicht groß sein und es muß genügend Fixierungsflüssigkeit (mindestens das 10fache Volumen des Gewebstückes) dieselben von allen Seiten umspülen

(Stücke in die Flüssigkeit hineinhängen, auf Watte auflegen, oder das Gefäß mit den zu fixierenden Gewebsstücken in Bewegung erhalten, z. B. durch Tragen im Arbeitsmantel). Beschleunigt wird die Fixierung durch Wärme bei 36°. Essigsäurezusatz zu Fixierungsflüssigkeiten ist von günstigem Einfluß auf die Fixierung, da nach *Fischer* die leicht angesäuerten Flüssigkeiten die Koagulation in den alkalischen Geweben befördern.

Die *Härtung* soll dem Gewebe die nötige Dichte geben, damit es schnittfähig wird. Die meisten zur Fixierung verwendeten Flüssigkeiten härten auch zugleich, so:

Formalin (40%ige Lösung von Formaldehyd), 1893 von *Blum* in die histologische Technik eingeführt, gestattet nahezu alle Färbemethoden, nur ist nach *Schmorl* notwendig, der Carmin- und Bakterienfärbung eine gründliche Auswässerung vorausgehen zu lassen. In stark bluthaltigen Geweben ruft es feine braune Niederschläge hervor, die oft sehr störend wirken. Um sie zu entfernen, empfiehlt *Schridde* 75%igen Alkohol, 25%ige Ammoniaklösung 200:1 durch eine halbe Stunde, dann wässern; *Gierke* Schwefelammonium; *Verocay* 1%ige wässrige Kalilauge, 80%igen Alkohol 1:25 durch 10 Minuten, wässern 5 Minuten, 80%igen Alkohol 5 Minuten und wässern. Fixierung und Härtung in 2–3%iger wässriger Formalinlösung mehrere Tage, in 10%iger 1–2 Stunden bis 4 Tage, bei 36° kürzer. Nachhärtung in aufsteigendem Alkohol (70%, 95% und absolut) je 24 Stunden.

Orth'sches Gemisch. Formalin unverdünnt, *Müllersche* Flüssigkeit 1:10, ist immer frisch zu bereiten, 12–24 Stunden bei 36°, dann wässern und härten in aufsteigendem Alkohol.

Formolalkohol nach *Parker*. Formalin unverdünnt, 95%iger Alkohol 1:10, 12–24 Stunden, dann 95%iger und absoluter Alkohol.

Alkohol (80%, 95% und absolut) eignet sich besonders gut für Bakterienfärbungen, führt aber bei sofortiger Anwendung höherer Konzentrationen zu starker Schrumpfung des Gewebes.

Müllersche Flüssigkeit. Kaliumbichromat, Natrium sulfuric., Aq. dest. 2.5:1.0:100.0 dringt langsam ein, daher Fixierung durch Tage bis Wochen, wobei die Flüssigkeit anfangs täglich zu wechseln ist; auswässern, härten in aufsteigendem Alkohol im Dunkeln, um Chromniederschläge zu vermeiden. Heute ist die reine *Müllersche* Flüssigkeit durch das *Orth'sche* Gemisch nahezu vollständig verdrängt.

Sublimat. In konzentrierter wässriger Lösung mit 5% Eisessig 2 bis 6 Stunden, nur für kleine und dünne Gewebsstücke, 24 Stunden wässern, 70%iger Alkohol mit Zusatz von Tinct. jodi bis zu braunroter Färbung. Unter Bildung von Quecksilberjodid entfärbt sich die Flüssigkeit; solange dies eintritt, muß der Jodalkohol durch Wechseln erneuert werden, dann weiter aufsteigende Alkoholhärtung. Besser als der gewöhnliche Jodalkohol wirkt eine alkoholische *Lugol'sche* Lösung (Kal. jodat. 5.0, Jod. pur. 0.5, Aq. dest. 5.0, 90%iger Alkohol 45.0). Enthalten die Schnitte noch Sublimatniederschläge, so sind auch diese noch durch Jodierung zu entfernen, worauf die Schnitte noch in Alkohol gewaschen werden.

Zenkersche Flüssigkeit. In 100.00 *Müllerscher* Flüssigkeit wird 0.5 Sublimat in der Wärme gelöst und vor dem Gebrauche noch 5.0 Eisessig zugesetzt, Fixierung 24 Stunden, dann wässern und jodieren wie bei einfacher Sublimatfixierung.

Hellysche Flüssigkeit. In 100.00 *Müllerscher* Flüssigkeit wird 0.5 Sublimat in der Wärme gelöst und dann 5.0 unverdünntes Formalin zugesetzt; Fixierung 6 Stunden, dann *Zenkersche* Flüssigkeit ohne Eisessigzusatz, 24 Stunden wässern. Jodierung soll nicht nötig sein, so daß die Härtung mit aufsteigendem Alkohol sich unmittelbar anschließen kann.

Osmiumsäure kommt für bakteriologische Zwecke höchstens in Form des *Flemmingschen* Gemisches in Betracht: 1% wässrige Chromsäurelösung 15.0, 2% wässrige Osmiumsäure 4.0 und Eisessig bis zu 1 cm³; Fixierung 24 Stunden, wässern, steigender Alkohol oder als *Hermannsches* Gemisch, in welchem 1%ige wässrige Platinchloridlösung die Chromsäure ersetzt.

Aus dem Gesagten ergibt sich für den praktischen Arzt, welcher Organstücke zur bakteriologischen Untersuchung übersendet, die Regel, dieselben, wenn die Entfernung nicht zu groß ist, entsprechend steril verpackt einzuschicken, oder von den Organen Ausstrichpräparate anzufertigen, dieselben zu fixieren und Gewebsstücke, am besten in 80 bis 95%igen Alkohol eingelegt, der Untersuchungsstelle zu übermitteln.

Die fixierten und gehärteten Gewebsstücke werden nun, insofern aus ihnen nicht Gefrierschnitte hergestellt werden, der *Einbettung* zugeführt. *Kühne* hat seinerzeit zur Einbettung der auf Bakterien zu untersuchenden Organstücke die *Anetholmethode* angegeben, welcher auch *Heim* warm das Wort redet.

Die in Alkohol gehärteten kleinen Organstücke werden mit Filtrierpapier abgetrocknet und in Fläschchen mit reinem Anisöl eingetragen. Öl. anisi pur. (von Schimmel & Cie., Leipzig) hat einen Erstarrungspunkt von unter 26°. Über Nacht bleiben die Organstücke im ätherischen Öl bei 36°. Am andern Tag wird die Objektplatte des Gefrierapparates mit Alkohol gereinigt und getrocknet sowie durch Auflegen eines rußfreien erwärmten Objektträgers gewärmt, damit das Anethol nicht sofort bei Berührung der kalten Platte erstarrt. Ist das Organstück mit einer Pinzette und dem daran haftenden Anisöl auf die Platte des Gefrierapparates übertragen, so genügen einige Hube des Äthergebläses, um Öl und Präparat zum Frieren zu bringen, womit das Objekt schnittreif geworden ist. Die auf dem Gefriermikrotom angefertigten Schnitte kommen in ein leeres Schälchen, in dem sie durch Übergießen mit warmem Anisöl aufgetaut werden; auf einem breiten Spatel wird das Öl von den Schnitten mit Filtrierpapier entfernt, worauf sie in Alkohol gebracht werden, der zur vollständigen Entfernung des Anethols mehrmals gewechselt wird. Damit sind die Schnitte für die Färbung vorbereitet, der die Anetholbehandlung eher förderlich als nachteilig zu sein scheint.

An Stelle der *Erstarrungstechnik* mit Anethol können die nicht gehärteten oder gehärteten Organstücke auch in Wasser gefroren werden, nur ist dazu nötig, daß der bei der Härtung eingebrungene Alkohol aus den Geweben völlig entfernt ist, was man durch Einlegen der Organstücke in Wasser erreicht, bis sie in demselben zu Boden sinken. Das Gefrieren der Präparate kann durch Ätherspray oder mit Hilfe flüssiger Kohlensäure bewerkstelligt werden. Die auf diese Weise gewonnenen Schnitte werden in Wasser von Zimmertemperatur übertragen, woselbst sie auftauen.

Heute sind zur Herstellung von Schnitten fixierter und gehärteter Objekte zwei Methoden der Einbettung im Gebrauche: die mit *Zelloidin* und die mit *Paraffin*. Für bakteriologische Zwecke ist letztere vorzuziehen, da hierbei die Schnitte auf den Objektträger geklebt werden, wodurch ein Ausfallen lose gefügter Gewebsteile viel weniger leicht möglich ist als bei der *Zelloidinmethode*, der überdies der Fehler anhaftet, daß sich die Einbettungsmasse mit den Anilinfarbstoffen

mehr oder weniger intensiv färbt. Hierdurch leidet die distinkte Färbung des Schnittes und wird verwaschen. Um diesem Übelstande vorzubeugen, löst man z. B. bei der Gramschen Färbung das Zelloidin durch Nelkenöl auf, was aber wieder zur Folge hat, daß aus den nicht auf den Objektträgern angeklebten Schnitten lockere Anteile ausfallen. Und gerade in diesen liegen häufig die Mikroorganismen, nach denen wir fahnden, z. B. die Aktinomycesdruse im Eiterherd. Zudem lassen sich mit der Paraffinmethode leichter dünne Schnitte gewinnen als mit der Zelloidinmethode.

Zelloidinmethode (*Schiefferdecker* u. *Blochmann*). Das Zelloidin (*Schering*, Berlin NW.) ist mit dem Kollodium chemisch identisch. In kleine Würfel zerschnitten, wird es im Brutschrank getrocknet und in einer abgemessenen Menge Alkohol absol. in einem weithalsigen, mit einem Glasstöpsel gut verschließbaren Glasgefäß zum Quellen gebracht. Nach 24 Stunden setzt man die gleiche Menge Aether sulfur. zu, als Alkohol verwendet wurde. Nach weiteren 24 Stunden sind alle Zelloidinwürfelchen gelöst. Aus der dickflüssigen Lösung stellt man durch Zusatz verschiedener Mengen von Alkohol absol. und Aether sulfur. aa. drei Konzentrationen, u. zw.: 1. eine dünne etwa 2%o, 2. eine mittlere etwa 3%o und 3. eine dicke etwa 6–10%oige Zelloidinlösung her. Bevor nun die Gewebstücke aus dem absoluten Alkohol in die erste Zelloidinlösung eingebracht werden, müssen sie in einem „Intermedium“ (*Mayer*) Alkohol absol. und Aeth. sulf. aa. verweilen. In jeder Zelloidinlösung, aufsteigend von 1–3, bleiben die Gewebstücke mindestens 24 Stunden liegen. Auf die Fläche eines Holz- oder Stabilitklötzchens wird dicke Zelloidinlösung aufgetragen und dann das Gewebstück mit der Fläche, von welcher die Schnitte angefertigt werden sollen, nach oben orientiert mit einer Pinzette aufgelegt. Oberfläche und Ränder des Stückes werden noch mit dickem Zelloidin umgeben. Nun läßt man das Zelloidin lufttrocknen, bis leichter Fingerdruck nicht mehr eindringt, und legt dann Klötzchen samt Präparat in 70–80% Alkohol zur Härtung des Zelloidins ein, was nach 3 bis 24 Stunden erfolgt ist. Kupfer härtet das Zelloidin in wasserfreiem reinen Chloroform nach.

Zelloidinschnitte werden unter konstanter Befeuchtung von Objekt und Messer mit 70–80%igen Alkohol gewonnen und in 70%igen Alkohol übertragen.

Statt Zelloidin läßt sich in gleicher Weise auch Photoxylin als Einbettungsmedium verwenden.

Paraffinmethode. Aus dem zur Härtung dienenden Alkohol absol. bringt man zur vollständigen Entwässerung die Gewebstückchen in Aceton oder reines Anilinöl, dann in Xylol, welches hierbei vollkommen klar bleiben soll. Ist dies nicht der Fall, dann ist das Gewebe ungenügend entwässert, was ein neuerliches Einlegen in Alkohol absol. erfordert. Im Xylol werden die Gewebstücke vollkommen durchsichtig und gelangen nun in eine konzentrierte Lösung von Paraffin in Xylol bei 36° durch etwa 2 Stunden. In einem auf etwa 60° eingestellten Wärmekasten ist das Paraffin zum Einbetten in 3 Glasschalen vorbereitet; diese enthalten Paraffin vom Schmelzpunkt 1. 46–48°, 2. 51–54° und 3. 56° gewonnen durch entsprechende Mischung eines Paraffins vom Schmelzpunkt von 45° und eines solchen von 56°. In jeder dieser Paraffinmischungen verweilen die Gewebstücke 1–2 Stunden und können nun „ausgegossen“ werden. Hierbei wird die Schale mit dem 3. Paraffin in ein Uhrschälchen, dessen Konkavität vorher gut angehaucht wurde, rasch ausgegossen und das Gewebstück darin mit der zu schneidenden Fläche nach oben orientiert und das Uhrschälchen zunächst auf kaltem Wasser schwimmen gelassen, dann untergetaucht, damit das Paraffin rasch erstarrt, geschmeidig und nicht spröde wird. Statt des Uhrschälchens kann man auch Papierkästchen oder metallene Einbettungsrahmen (*Gaylor*) verwenden. Ist

das Paraffin vollkommen erstarrt, löst es sich in der Regel von selbst aus dem Uhrschälchen und steigt an die Oberfläche des Wassers. Rings um das Präparat wird nun das Paraffin mit Hinterlassung eines mehrere Millimeter breiten Rahmens mit dem Messer entfernt, der „zugeschnittene“ Paraffinblock auf ein Holzklotzchen mit verflüssigtem Paraffin von 56° aufgeklebt.

Xylol als „Intermedium“ macht die Objekte oft spröde und fest. Man kann es ersetzen durch Chloroform, in welches dann wie beim Xylol Paraffinstückchen so lange eingetragen werden, bis bei 52° keine Gasblasen aus dem geschmolzenen Paraffin aufsteigen, wodurch die Verdampfung des Chloroforms sich anzeigt. Sehr bewährt hat sich Zedernöl als Intermedium, in welchem die Gewebsstückchen bis zu 24 Stunden verbleiben, um dann in Tetrachlorkohlenstoff und Tetrachlorkohlenstoff mit eingetragenen Stückchen von Paraffin bei 36° übertragen zu werden.

Walker legt die gehärteten Organstücke vor der Einbettung in Paraffin durch 24 Stunden in Terpentinöl, Chloroform, Benzol oder am besten in Toluol bei 36°.

Paraffinschnitte werden trocken angefertigt. Sie rollen sich oft ziemlich stark, was dadurch zu vermeiden ist, daß man während des Schneidens das obere Ende des Schnittes mit einem Pinsel an das Messer drückt. Ein vollständiges Ausbreiten der Schnitte erfolgt in Wasser von etwa 45°. Die Paraffinschnitte werden dann auf den Objektträger angeklebt: 1. Durch Übertragen derselben aus dem warmen Wasser auf den Objektträger, dann läßt man das überschüssige Wasser abfließen und stellt Objektträger mit Schnitt auf 12 Stunden in den Thermostaten bei 36°. Das restierende Wasser zwischen Objektträger und Schnitt kann man auch durch Aufpressen einer mehrfachen, mit Alkohol von 95% getränkten Lage Filtrierpapier mechanisch entfernen. 2. Durch Aufkleben mit Eiweißglycerin (geschlagenes Eiweiß von einem Ei filtriert, mit der gleichen Menge Glycerin versetzt und ein Krystall Carbolsäure oder Thymol, oder zu 100 g der Mischung 1 g Natr. salicylic.). Ein kleiner Tropfen dieser Flüssigkeit wird auf dem Objektträger mit dem Finger zu einer ganz dünnen, kaum sich färbenden Schicht verrieben, auf welche der Schnitt aufgezogen wird, um dann noch 12 Stunden bei 36° im Thermostaten belassen zu werden. Nach der sog. japanischen Methode wird das aufgestrichene Eiweiß durch Erwärmen des Objektträgers direkt über der Flamme zur Gerinnung gebracht und dann erst die Schnitte aufgezogen. 3. Endlich fixiert man die Paraffinschnitte auf dem Objektträger durch Übergießen mit einer stark verdünnten Zelloidinlösung. Bevor dies erfolgt, müssen Schnitte und Objektträger wasserfrei gemacht sein, was mit Hilfe einer aufgelegten, mit Alkohol getränkten, mehrfachen Filtrierpapierschicht geschieht.

Die durch den Krieg verursachte schwere Beschaffungsmöglichkeit der zur Paraffineinbettung nötigen Vorharze veranlaßte Coronini, Paraffinöl, Petroleum und Tetralin (letzteres erhältlich durch die Tetralingesellschaft in Wien XVI) anzuwenden. Petroleum gestattet das Übertragen der Gewebsstücke direkt aus dem Alkohol absol. in das Paraffin, macht also Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff entbehrlich, hat aber den Nachteil, die zum Schneiden erforderliche Konsistenz des Paraffinblockes zu beeinträchtigen. Um dies zu verhüten, muß daher das Paraffin 2—3mal gewechselt werden. Im Tetralin sinken erst völlig wasserfreie Gewebsstücke zu Boden und werden außerordentlich transparent. Das durch Wasser oder Alkohol verunreinigte Tetralin kann durch Erhitzen wieder davon befreit werden, seine Verwendung gestaltet sich daher sehr sparsam. Tetralin ist auch zum Entparaffinieren und Aufhellen der Schnitte ebenso verwendbar wie zum Auflösen der Einschlußharze.

Die Anfertigung der Schnitte erfolgt mit Hilfe eigener Apparate, Mikrotome, deren Gebrauchsanweisung in den Lehrbüchern der histologischen Technik sowie in den Fabrikskatalogen ausführlich wiedergegeben ist.

Färbetechnik.

Die angefertigten Schnitte werden nun gefärbt; ungefärbte Objekte werden bei bakteriologischen Untersuchungen nur ganz ausnahmsweise verwendet. Gefrierschnitte gelangen aus der Farbstofflösung in Wasser und werden in Alkohol oder $\frac{1}{2}$ —1%iger Essigsäure differenziert; Alkohol besorgt gleichzeitig in höheren Konzentrationen die Entwässerung der Schnitte, welche entweder durch Einlegen in Glycerin durchsichtig gemacht werden, oder es erfolgt die Aufhellung der entwässerten Schnitte durch Xylol, wonach Einschließung in Kanadabalsam möglich ist. Die Färbung der Zelloidinschnitte wird in Schälchen vorgenommen und das Präparat erst nach der Differenzierung, Entwässerung und Aufhellung auf den Objektträger gebracht. Um die aus Paraffin geschnittenen und auf dem Objektträger angeklebten Präparate färben zu können, muß das Paraffin entfernt werden; dies geschieht mit Xylol 15 Minuten, dann Alkohol absol. 10 Minuten, 80%iger Alkohol, Wasser.

Zur Färbung der Bakterien im Schnitt bedient man sich so wie bei der Färbung von Deckglasausstrichpräparaten mit Vorteil der Anilinfarbstoffe in wässrig-alkoholischer Lösung, doch muß man Schnitte entsprechend länger färben, wobei Überfärbung eintritt, die eine nachfolgende Differenzierung erfordert. Manche Bakterien sind gegen Alkohol sehr empfindlich, so daß die Differenzierung und Entwässerung mit diesem Reagens sehr vorsichtig vorzunehmen ist. Da zur Färbung in der Regel wässrig-alkoholische Anilinfarbstofflösungen verwendet werden, darf zur Aufhellung Carbol-Xylol nicht verwendet werden, weil Carbolsäure Anilinfarben löst. Das gleiche bewirkt auch Nelkenöl, dem der Vorzug zukommt, Zelloidin zu lösen; daher kann Nelkenöl nur bei nicht vollkommen differenzierten Schnitten zur Anwendung kommen. Endlich muß betont werden, daß absoluter Alkohol mit Anilinfarben eine unlösliche Verbindung eingeht; aus diesem Grunde ist er zur Differenzierung nicht geeignet; sie kann nur mit 80—90%igem Alkohol vorgenommen werden.

Nach den

a) Methoden der einfachen Bakterienfärbung

erscheinen Zellkerne und Bakterien in gleicher Farbe gefärbt:

Methylenblau ist einer der besten Farbstoffe, da es beinahe alle Bakterien färbt. Nach *Kühne* gelingt es, mit **Carbolmethylenblau*** innerhalb $\frac{1}{2}$ Stunde die verschiedensten Mikroorganismen zu färben. Leprabacillen bedürfen einer Färbung von 1—2 Stunden.

Carbolmethylenblau *methode nach Pregl*. Paraffinschnitte 5 bis 10 μ mit Eiweißglycerin oder mit alkoholischer Aceton-Zelloidin-Lösung auf-

* 1.5 g Methylenblau wird in einer Reibschale mit 10.0 cm³ Alkohol absol. übergossen, damit unter Vermeidung zu starken Aufdrückens und unter allmählichem Zusatz von 100.0 cm³ 5%igen Carbolwassers verrieben und gelöst. Bei nicht zu starkem Verbrauche empfiehlt es sich, nur die Hälfte der Farblösung her-

geklebt (in kleine Stückchen geschnittenes und sorgfältig getrocknetes Zelloidin wird in wasserfreiem Aceton, über geglühtem Kupfersulfat gestanden, aufgelöst. Von der so gewonnenen zähflüssigen, trüben Lösung gibt man einen dicken Tropfen auf 5 cm³ Alkohol absol. und bewahrt diese zum Gebrauche fertige alkoholische Aceton-Zelloidin-Lösung in Fläschchen mit gut eingeriebenem Glasstöpsel auf). Der Schnitt wird in Alkohol absol. vollständig entwässert und mit dem Deckglas so herausgefangen, daß er sich vollkommen darauf ausbreitet. Der überfließende Alkohol wird von der Seite mit Filtrierpapier abgesaugt und nun läßt man rasch von einem Glasstab einen Tropfen obiger Aceton-Zelloidin-Lösung zufließen. Durch Schwenken des Deckglases wird der Alkohol zum Verdunsten gebracht und dann das Deckglas in Wasser gelegt. Aus dem Wasser entfernt, saugt man von der Seite her den letzten Rest Wasser ab und läßt aus einer Pipette von der Seite her Carbolmethylenblau (*Kühne*) zufließen, bis der Schnitt reichlich bedeckt ist. Nach $\frac{1}{2}$ —1 Minute Färbung abspülen mit Wasser, Differenzierung in 50%igem Alkohol, bis die Schnitte blaßblau mit einem Stich ins Grünliche erscheinen. Entwässerung in Alkohol absol., Aufhellung in Xylol, Balsam. Genügt diese Färbung nicht, dann vorsichtig in der Wanne färben.

Mikroorganismen dunkelblau, Zellkerne blaßblau, Protoplasma farblos.

Löfflersches Methylenblau (Konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung 30,0, 0,01%ige Kalilauge 100,0) 5—30 Minuten, differenzieren in $\frac{1}{2}$ —1%iger Essigsäure 10—30 Sekunden, 95%igem Alkohol 2—5 Minuten, Alkohol absol. entwässern, Xylol, Balsam.

Nicoll modifiziert diese Methode für *Bac. typhi* und *Bac. cholerae gallinar.*, indem er an die Färbung Auswaschen mit 10%iger Gerbsäurelösung $\frac{1}{2}$ —1 Minute anschließt.

Polychromes Methylenblau nach *Unna*. Fixierung in *Orthschem* Gemisch empfehlenswert. Färben in *Pranters* Orceinlösung (Orcein D Grübler 0,1, Acid. nitric. offic. 2,0, 70%iger Alkohol 100,0) 8—24 Stunden, abspülen in 70%igem Alkohol, Wasser, polychrom. Methylenblau 10—30 Minuten auch länger, Aq. destill., differenzieren in *Unnas* Glycerin-Äther-Mischung (*Grübler*), bis kein Farbstoff mehr entweicht, Aq. destill., 70%igem Alkohol einige Minuten, Alkohol absol., Xylol, Balsam. Bakterien und Kerne dunkelblau, Protoplasma graubraun, elastische Fasern rotbraun. Geeignet zur Darstellung schwer sich färbender Bakterien: *Unna-Ducroys* *Streptobacillus*, *Gonokokken*, *Bac. mallei*.

zustellen, weil mit der Zeit ihre Färbekraft abnimmt. Vor dem Gebrauche sind alle wässerigen Farbstofflösungen zu filtrieren.

In dieser Lösung bleiben die Schnitte $\frac{1}{2}$ Stunde, werden dann mit Wasser abgespült und in angesäuertem Wasser (500,0 cm³ Wasser, destilliertes oder reines, gewöhnliches, vorher ausgekochtes Wasser und 10 Tropfen Salzsäure) bis zur blaßblauen Färbung differenziert und sofort nach Abspülung in einer Lösung von Lithium carbonicum (6—8 Tropfen einer konzentrierten wässerigen Lösung von kohlensaurem Lithium auf 10,0 Wasser) in eine Schale mit reinem Wasser übertragen, dann in Alkohol absol. und schließlich in Methylenblau-Anilinöl (in einer Reibschale verreibt man ohne zu starken Druck eine Messerspitze voll Methylenblau mit 10,0 cm³ gereinigtem Anilinöl. Wenn auch nicht alle Farbe aufgelöst wird, so gießt man das Ganze unfiltriert in ein Fläschchen, in welchem nach einiger Zeit das Öl durch Absetzen vollkommen klar wird. Einige Tropfen davon werden in einem Blockschälchen mit reinem Anilinöl bis zur gewünschten Konzentration versetzt). Einige Minuten Aufenthalt in diesem genügen, um den Schnitt wasserfrei zu machen, ohne die Bacillenfärbung durch Ausziehen der Farbe zu schädigen. Nach der Entwässerung wird der Schnitt in reinem Anilinöl abgespült, in ein leichtflüssiges ätherisches Öl (*Thymen*, *Tereben* u. s. w.) etwa 2 Minuten zur Aufhellung und Anilinölentziehung gebracht, von wo er zur Entölung in Xylol gebracht wird, um schließlich in Balsam eingeschlossen zu werden.

Fraenkel modifizierte diese Methode, indem er zur Differenzierung ein Gemenge von 33%iger Tanninlösung, $\frac{1}{2}$ %iger wässriger Säurefuchsin- oder Orangefärbung und Glycerin-Äther-Mischung aa. verwendet.

Gentiana- oder *Methylviolett* (2 cm³ konzentrierte alkoholische Violettlösung auf 100 cm³ Aq. destill.) 10–20 Minuten, Wasser, differenzieren in 70%igem Alkohol, Alkohol absol., Xylol, Balsam.

Fuchsin färbt nach *Kühne* zum Unterschiede von Methylenblau Tuberkel-, Lepra- und Mäusebacillen sehr sicher, scharf und dauerhaft, während es beim Rotzbacillus entweder ganz versagt oder doch weit dem Methylenblau zurücksteht.

Verdünntes Carbofuchsin (Carbofuchsin : Wasser = 2–5–10 : 100). Färbung wie bei *Löfflers* Methylenblau.

Verdünntes Carbofuchsin nach *Pfeiffer* (für Vibr. chol. asiat. und Influenzabacillus). (Carbofuchsin : Wasser = 3 : 10) 15–30 Minuten, mit Vorteil bei 36°, differenzieren in mit Essigsäure (etwa 1%/o) schwach angesäuertem 95%igen Alkohol, bis der Schnitt hellviolett erscheint, Alkohol absol., Xylol, Balsam.

Die braunen Anilinfarbstoffe (Vesuvium, Bismarckbraun u. s. w.) finden für die einfache Bakterienfärbung in Schnittpreparaten wenig Anwendung.

b) Methoden der Doppelfärbung, elektive Methoden der Bakterienfärbung,

bei welchen die Bakterien in einer andern Farbe dargestellt werden als die Gewebsbestandteile.

Nach *Kühne*: Die mit Carmin vorgefärbten, in Carbolmethylenblau nachgefärbten Schnitte werden mit einer wässrigen Lösung von Nigrosin mit einem Zusatz von 10% Chlorhydrin differenziert, im übrigen wie bei einfacher Methylenblaufärbung weiter behandelt. Kerne rot, Spaltpilze blau, Protoplasma und Capillaren grau.

Für intravascular gelegene Mikroorganismen empfiehlt *Kühne* folgende Methode:

Nach Vorfärbung mit Carmin — a) nach *Cucatti*: 20.0 g krystallisiertes kohlen-saures Natrium wird in 100.0 cm³ warmem Wasser gelöst, 5.0 g Carmin zugesetzt, aufgeköcht, vom Feuer genommen und 30.0 cm³ absoluter Alkohol zugesetzt. Tags darauf wird filtriert und langsam 300.0 cm³ Wasser, 8.0 cm³ reine 20%ige wässrige Essigsäure und 2.0 g Chloralhydrat zugesetzt. Färbungsdauer etwa $\frac{1}{4}$ Stunde. b) Nach *Orth*: In einer kalt gesättigten Lösung von Lithium carbonicum wird 2.5 g Carmin auf 100.0 cm³ Flüssigkeit eingetragen. Färbungsdauer etwa $\frac{1}{4}$ Stunde. c) Salzsäure-Carmin: 50.0 cm³ Alkohol von 60–80% werden mit 4 Tropfen Salzsäure und 0.5 g Carmin versetzt. 10 Minuten gekocht und nach dem Erkalten filtriert — werden die Schnitte einige Minuten in Carbofuchsin nachgefärbt, leicht in Alkohol entwässert und schließlich in Säureviolett-Anilinöl ausgezogen, wozu je nach der Schnittdicke $\frac{1}{2}$ –2 Stunden nötig sind. Kerne carminrot, Protoplasma violett, Bacillen fuchsinrot.

Gramsche Methode färbt nicht alle Bakterien, sondern nur bestimmte, die nach diesem Verhalten als grampositive Mikroorganismen bezeichnet werden.

Härtung in Alkohol, Formol, *Müllerscher* Flüssigkeit, *Orthschem* Gemisch oder Sublimat; Einbettung in Zelloidin oder besser in Paraffin. Überfärbung der Schnitte in Anilinwasser- oder Carbolwasser-Methyl- oder -Gentianaviolett: Alkohol absol. 3.0, Anilinum pur. 7.0, Aq. destill. 90.0 werden gut geschüttelt, durch ein feuchtes Filter auf Methyl- oder Gentianaviolett in Substanz und im Überschuß (5 g) filtriert, oder zu 90 cm³ Anilinwasser werden 11 cm³ gesättigte

alkoholische Gentianaviolettlösung zugesetzt, oder man hat zwei Stammlösungen vorrätig: Stammlösung I. Alkohol absol. 33 cm³, Anilinöl 9 cm³, Gentianaviolett im Überschuß. Stammlösung II. Gesättigte wässrige Lösung von Gentianaviolett. 3 cm³ der Stammlösung I werden mit 27 cm³ der Stammlösung II gemischt, frisch filtriert. Färben 5 Minuten, Wasser, Beizen in *Lugolscher* Lösung (Jod pur. 1·0, Kal. jodat. 2·0, Aq. destill. 300·0) oder in gesättigter Jodlösung (Kal. jodat. 5·0, Aq. destill. 100·0, Jodi puri im Überschuß) 1—2 Minuten, dann differenzieren in Alkohol von 90%, Alkohol absol. eventuell Nelkenöl (namentlich bei Zelloidinschnitten um das Zelloidin zu lösen), Xylol, Balsam.

Die Kernfärbung kann der *Gramschen* Färbung vorausgeschickt werden oder sie folgt derselben nach. Bei Vorfärbung ist darauf zu achten, daß die Farbstofflösung frei von Mikroorganismen ist; es empfehlen sich hiezu besonders die durch Kochen hergestellten Carminlösungen: Lithioncarmin (*Orth*) (2·5 g Carmin rubr. opt. in 100 cm³ gesättigter wässriger Lösung von Lithion carbonicum) 15—30 Minuten, differenzieren in salzsaurem Alkohol (1 Teil Acid. hydrochlor. : 100 Teile 70%iger Alkohol) bis die Gewebsstruktur deutlich hervortritt, Wasser kurz, dann Gramfärbung. Zur Vorfärbung kann auch Alauncarmin (1·0 g Carmin, 100 cm³ 5%ige wässrige Kalialaunlösung 10 Minuten kochen, nach dem Erkalten filtrieren) verwendet werden. Die Nachfärbung wird mit einem roten oder braunen Anilinfarbstoff in alkoholisch wässriger Lösung vorgenommen, verdünntes Carbofuchsin (1 : 20), Bismarckbraun oder Vesuvin (2·0 g Bismarckbraun, 60 cm³ 96%igen Alkohol, 40 cm³ Aq. destill. aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren). Diese Färbung wird nach der Differenzierung in Alkohol vorgenommen, nachdem die Schnitte in 70%igen Alkohol übertragen worden sind. Nach der Kontrastfärbung differenzieren in Alkohol von 95%, dann Aufhellung und Einschließung. Die Nachfärbung mit Anilinfarben schließt den Vorteil in sich, daß bei derselben die nach *Gram* nicht darstellbaren Mikroorganismen zur Ansicht gebracht werden, was bei der Vorfärbung mit Carmin nicht der Fall ist. Greift die Anilinwasser-Gentianaviolett-Färbung nicht gut an, so schaltet man vor der Gramfärbung eine Oxydation und Reduktion ein, indem die Schnitte in 1%iger wässriger Lösung von Kalium hypermanganicum mit 2 Volumen Wasser verdünnt auf 10 Minuten eingetragen, dann in Wasser gewaschen und in 5%iger wässriger Oxalsäurelösung mehrere Stunden reduziert werden.

Zur *Gramschen* Methode der Bakterienfärbung in Geweben und Organen wäre noch zu bemerken, daß es Bakterien gibt, welche nicht absolut grampositiv sich verhalten, sondern wo nur ein Teil derselben nach der *Gramschen* Methode darstellbar ist, der andere nicht, so daß in den *Gram*-Präparaten bei Carminvorfärbung viel weniger Bakterien nachweisbar sind, als in den analogen nach der einfachen Färbungsmethode mit wässrig-alkoholischen Anilinfarbstofflösungen tingierten Schnitten, z. B. *Bac. diphtheriae*. Auf den Ausfall der *Gramschen* Färbung kann auch die Art der Fixierung und Härtung von Einfluß sein; im allgemeinen fördert die Härtung in *Müllerscher* Flüssigkeit sie und bewirkt es im besonderen, daß z. B. der *Bac. scleromatis* sich tingiert, während er nach anderen Härtungsmethoden sich entfärbt. Nach der *Gramschen* Methode färben sich auch die säurefesten Bacillen, nur muß der Farbstoff längere Zeit, 24 Stunden bei Zimmertemperatur oder zwei Stunden bei 36°, einwirken. Manche Bakterien sind für Alkohol besonders empfindlich und entfärben sich bei der Differenzierung mehr oder weniger vollständig.

Diesem Übelstande zu begegnen, dient *Weigerts* Modifikation der *Gramschen* Methode: ungefärbte oder mit Carmin vorgefärbte Schnitte werden 5—20 Minuten in Anilinwassergentiana- oder -methylviolett gefärbt, in Wasser gewaschen, mit Jodjodkalilösung 1—3 Minuten gebeizt, mit Anilinölxylol 2:1, dann aa., dann 1:2 differenziert und schließlich in reinem Xylol aufgehellt und in Zedernöl eingeschlossen.

Kühnes Modifikation der *Gramschen* Methode. Färbung der Schnitte in der mit der Hälfte einer 1%igen wässrigen Lösung von kohlensaurem Ammoniak versetzten Violettlösung (10 g Krystallviolett wird in 90·0 cm³ Wasser und 10·0 cm³ Alkohol gelöst) oder Viktoriablaulösung (10 g Viktoriablau in 50·0 cm³ 50%igen Alkohol gelöst) durch 5 Minuten. Gründliches Abspülen in Wasser, Übertragung in Jodjodkaliumlösung (20 g Jod, 40 g Jodkalium in 100·0 cm³ Wasser gelöst. Davon so viel zu Wasser zugesetzt, bis die Flüssigkeit Madeirafarbe angenommen hat) auf 2—3 Minuten, Abspülen in Wasser, Ausziehen des Farbstoffes in Fluorescein, Alkohol, Auswaschen des letzteren in reinem Alkohol, Übertragen in Nelkenöl oder in Anilinöl und schließlich Ausziehen des letzteren in einem dünnflüssigen ätherischen Öl und Xylol, Einschließen in Balsam: Bakterien scharf dunkelblau in dem niederschlagsfreien, vollständig entfärbten Gewebe. Wählt man eine Doppelfärbung besonders mit Carmin, so tritt nach Wochen oder Monaten ein Abblassen der Pilze ein, wohl infolge einer chemischen Einwirkung der anderen verwendeten Farbstoffe. Trotzdem empfiehlt *Kühne* die Doppelfärbung mit Carmin der schönen Resultate wegen. Zu derselben werden die Schnitte zunächst in der Carminlösung nach *Cuccati* gefärbt, oder in der Weise behandelt, daß sie zuerst in der *Orthschen* alkalischen Carminlösung gut gefärbt, gründlich in Wasser abgespült und dann einige Stunden der Einwirkung von Säurecarmin ausgesetzt werden; hierauf neuerlich gutes Ausspülen in Wasser, Entwässern in Alkohol und dann Anwendung der modifizierten *Gramschen* Methode. Als solche kann auch eine zweite Modifikation *Kühnes* in Anwendung kommen.

Die entwässerten, ungefärbten oder mit Carmin vorgefärbten Schnitte kommen auf 10 Minuten in eine mit Salzsäure (1 Tropfen auf 50·0 cm³) versetzte konzentrierte wässrige Violettlösung, werden dann in Wasser gut abgespült, wie gewöhnlich mit Jodjodkaliumlösung behandelt, wieder in Wasser abgespült, einige Sekunden in absoluten Alkohol getaucht und schließlich in reines Anilinöl gebracht, welches auszieht und differenziert, sowie den letzten Wasserrest aufnimmt. Nach vollendeter Entfärbung Übertragung in ätherisches Öl, Xylol und Einschließen in Balsam.

Will man Tuberkelbacillen violett färben, so ist die erste Modifikation *Kühnes* zu wählen, nur sind die Schnitte 1—2 Stunden in der Farbe zu belassen.

Methode von *Claudius*:

Färbung in 1%iger wässriger Methylviolettlösung 1 Minute, Wasser, abtrocknen mit Filtrierpapier, halbesättigte wässrige Pikrinsäurelösung 1 Minute. Wasser, abtrocknen mit Filtrierpapier, entfärben in Chloroform oder Nelkenöl, trocknen mit Fließpapier, einbetten. Kernfärbung mit Carmin.

Pyronin-Methylgrün nach *Unna-Pappenheim*. Härtung in Alkohol oder *Orthschem* Gemisch empfehlenswert. Methylgrün-Pyronin (Methylgrün 00 kryst. gelbl. [Grübler] 0·15, Pyronin 0·25, 96%iger Alkohol 2·5, Glycerin 20·0, 0·5%iges Carbolwasser [100·0 Wasser, 0·5 g Acid. carbol. cryst.] 100·0) 10 bis 15 Minuten, Wasser abspülen, differenzieren in 70%igem Alkohol, Alkohol absol., Xylol, Balsam. Bakterien leuchtend rot, Kerne blaugrün, Plasmazellen im Protoplasma tiefrot mit juxtanuclearem hellen Zentrum.

Giemsa methode nach *Giemsa*. Fixierung in konzentrierter wässriger Sublimatlösung und Alkohol absol. 2:1 mindestens 2 Tage. Härten in auf-

steigendem Alkohol, Paraffineinbettung. Die entparaffinierten Schnitte jodieren in: Aq. destill. 100:0, Jodkalium 2:0, *Lugolsche Lösung* 3:0 etwa 10 Minuten; abspülen in Aq. destill.; 0.5%ige Natriumthiosulfatlösung wässrig 10 Minuten; abspülen in Leitungswasser 5 Minuten, in destilliertem Wasser kurz, färben mit frisch verdünnter Giemsalösung (1 gtt. auf 1 cm³ Aq. dest.) 2—12 Stunden auch länger, nach 1/2 Stunde wechseln. Abspülen in destilliertem Wasser, differenzieren und entwässern in Aceton + Xylol 95:5, dann 70:50, dann Xylol pur; aufhellen und einbetten in Zedernöl.

Modifikation nach *Schridde*. Schnitte aus Aq. destill. in die Farblösung: 2 gtt. des *Grüblerschen* Farbstoffes zu 1 cm³ Aq. destill. 20 Minuten; abspülen in Aq. destill. gründlich, trocknen mit Filtrierpapier, entwässern in reinem Aceton 1/2—1 Minute, aufhellen in reinem Xylol oder Toluol, einschließen in neutralem Kanadabalsam.

Modifikation nach *Sternberg*. Alkoholhärtung; verdünnte Giemsalösung (0.4—0.5 cm³ auf 20 cm³ gekochtes destilliertes Wasser) 20—24 Stunden; abspülen in Aq. destill., differenzieren in 1/2%iger Essigsäure kurz, bis der Schnitt rötlich wird, Wasser, abtrocknen mit Filtrierpapier, differenzieren und entwässern in Alkohol absol., wobei die Schnitte wieder blau werden, Xylol, Balsam.

May-Grünwald-(Jenner-) Methode nach *Zieler*. Härtung in *Orthschem* Gemisch oder in *Zenkerscher* Flüssigkeit, Paraffineinbettung; Färben in *May-Grünwald-Farblösung* (fertiger Farbstoff von *Grübler*, Tabletten von *Borough, Welcome & Cie.* in 10 cm³ Methylalkohol zu lösen oder man stellt sie selbst her: 1 l 1%ige Lösung von Eosin in Aq. destill. wird gemischt mit 1 l 1%iger Lösung von Methylenblau med. in Aq. destill. Mehrere Tage stehen lassen, mit Saugpumpe filtrieren, Filtrerrückstand so lange nachwaschen, bis das Filtrat ungefärbt ist. Vom Filtrerrückstand wird eine gesättigte Lösung in Methylalkohol hergestellt) 2—3 Minuten; gründlich abspülen in Aq. dest., Trocknen mit Filtrierpapier, reines Aceton, aufhellen in reinem Xylol oder Toluol, einschließen in Kanadabalsam.

Zur Doppelfärbung gramnegativer Bakterien in Schnitten empfiehlt *Kossel* folgende Modifikation der *Romanowsky-Färbung*: 1 cm³ konzentrierter wässriger Methylenblaulösung (Methylenblau med. Höchst) mit 10 cm³ Aq. dest. verdünnt, wird mit 3—6 gtt. 5%iger wässriger Sodalösung alkalisiert. Unter Schütteln wird 0.5—1.0 cm³ 1%iger wässriger Eosinlösung (Eosin BA extra Höchst) tropfenweise zugesetzt, wobei kein Niederschlag entstehen soll. Färbung mit dieser Farbe 1/2—1 Stunde bei 37°, kurz abspülen in 1/4%iger Essigsäure, differenzieren in 70%igem Alkohol; sind die Schnitte rosa, dann Alkohol absol., Xylol, Zedernöl, Bacillen blau, Zellen rot.

c) Besondere Färbungsmethoden.

1. Für säurefeste Bakterien, vor allem Tuberkelbacillen:

Zum Nachweise von Tuberkelbacillen in Organschnitten empfiehlt *Heim* die Härtung in *Müllerscher* Flüssigkeit nicht. Nach *Pacinotti* gelingt sie, wenn die Härtungsflüssigkeit gut ausgewaschen wird, an Gefrierschnitten, die mit Alkohol behandelt sind. Nach meinen Erfahrungen kann ich *Heims* Ansicht nicht teilen; die Härtung in *Müllerscher* Flüssigkeit beeinträchtigt die Färbung der Tuberkelbacillen kaum, wenn die Organstücke gut ausgewässert werden, ein Vorgang, der, um gute Tinktionen zu erhalten, bei dieser Methode der Fixierung ganz all-

gemein bekannt ist. Ungünstig finde ich dagegen die Fixierung in Formol; die besten Resultate gibt die Härtung in aufsteigendem Alkohol.

Letulle bettet die in *Müllerscher* Flüssigkeit gehärteten Gewebe in Zelloidin ein und färbt zunächst die Kerne mit Hämatoxylin, dann die Tuberkelbacillen mit Carbofuchsin, wäscht in Wasser ab, entfärbt $\frac{1}{2}$ Minute in Alkohol, dann Jodgrün 5 Minuten (10 g in 2%igem Carbolwasser), entwässert in Alkohol, hellt in Bergamotteöl auf und schließt in Balsam ein. Da sich das Zelloidin mit dem Carbofuchsin ziemlich intensiv färbt, ist diese Einbettungsmethode für die Tuberkelbacillenschnitte nicht empfehlenswert. *Heim* hält die Anetholmethode für die geeignetste, da sie ganz allgemein die Färbung von Bakterien zu fördern und dauerhaft zu machen scheint. Diese vorteilhafte Wirkung ist nach *Heim* auch anderen Ölen zuzuschreiben, zumal *Cirincione* in absolutem Alkohol gehärtete Gewebstücke durch 12 Stunden mit Bergamotteöl durchtränkt, 24 Stunden in Kakaobutter bei 35° einbettet. Diese wird in kaltem Wasser zum Erstarren gebracht und aus der festen Masse Schnitte angefertigt, aus denen die Kakaobutter durch Einlegen in Bergamotteöl wieder entfernt wird, worauf die Schnitte in Alkohol übertragen werden.

Die zur Färbung der Tuberkelbacillen notwendige längere Dauer der Einwirkung des Carbofuchsin wird bei Schnitten durch Färben derselben bei Zimmertemperatur während 24 Stunden oder bei Brutofentemperatur während 2 Stunden erzielt.

Zur Differenzierung verwendet *Czaplewski* eine sehr schwache Säure in Form der *Ebnerschen* Entkalkungsflüssigkeit (Kochsalz 0.5 g, Salzsäure 0.5 cm³, Spiritus 100.0 cm³, destilliertes Wasser 20.0 cm³). *Kühne* erkennt die entfärbende Wirkung des Malachitgrüns und vermeidet also die Verwendung von Säure. Nach Färbung in kaltem Carbofuchsin (15 Minuten) spült er in Wasser und Alkohol ab und entfärbt mit einer konzentrierten Lösung von Malachitgrün in Anilinöl hellster Sorte. Die Entfärbung erfolgt bei dünnen Schnitten bereits in 2—3 Minuten, bei dicken später und wird durch Übertragen in Terpentinöl kontrolliert; dann abspülen in Anilinöl, Terpentinöl, Xylol, Balsam. Das Terpentinöl entzieht dem Schnitte allmählich die Malachitgrünfärbung, die man durch Nachfärbung mit wässrigem Methylenblau ersetzen kann, wenn nicht eine Vorfärbung mit Kernschwarz oder Carbolschwarzbraun vorausgeschickt worden ist.

Zum gleichzeitigen Studium der histologischen Struktur des tuberkulösen Granulationsgewebes empfiehlt *Israel* folgendes Verfahren: kleine Gewebstücke werden 1 Stunde in konzentrierter Sublimatlösung fixiert und dann am besten im Dialysator von *F. E. Schultze* in Alkohol gehärtet. Zur Einbettung verwendet er Paraffin und klebt die Schnitte mit Kollodium auf. Kernfärbung mit *Böhmers* Hämatoxylin 1—2 Minuten, abspülen in destilliertem Wasser, Carbofuchsin bei Zimmertemperatur 3—5 Minuten, verdünnte *Lugolsche* Lösung 1 Minute (nicht länger!), Anilinöl, dann Anilinöl-Xylol (2:1) bis keine Farbwolken mehr sich entfernen, Xylol, Xyloldamarlack.

Methode von Koch-Ehrlich. Färben mit Anilinwasser-Fuchsin oder -Methylviolett, 2 Stunden im Thermostaten bei 36° oder 24 Stunden bei Zimmertemperatur, auswaschen, differenzieren in 33%iger Salzsäure kurz und 70%igem Alkohol länger, nachfärben mit wässriger Methylenblaulösung (bei Fuchsin-vorfärbung) mit wässriger Bismarckbraunlösung (bei Vorfärbung mit Methylviolett) 1—2 Minuten, oder auch kurzes Nachfärben mit Hämatoxylinlösung, wässern, Alkohol 95%, Alkohol absol., Xylol, Balsam.

Die Verwendung des 70%igen Alkohols zur Entfärbung ist wichtig, um auf diese Weise Täuschungen mit säurefesten, aber nicht alkoholfesten Mikroorganismen, z. B. *Smegmabacillen* zu entgehen.

Modifikation nach *Kühne*. Färbung der Schnitte in Carbofuchsin (10 g Fuchsin, 100 cm³ Alkohol von 95% und 1000 cm³ 5%iges Carbolwasser) durch 10 Minuten, Entfärben derselben in 30%iger Salpetersäure mit nachfolgendem Ausziehen in 60%igem Alkohol, bis sie nur noch rosa gefärbt sind. Auswaschen der Säure in viel Wasser, 3 Minuten Entwässerung in absolutem Alkohol und Übertragung in Methylgrün-Anilinöl (wird in derselben Weise bereitet wie Methyleneblau-Anilinöl) durch 5–10 Minuten. Letzteres wird mit reinem Anilinöl zur Hälfte verdünnt; aus dieser Farbe kommen die Schnitte direkt 2 Minuten in ätherisches Öl, Thymen, Tereben u. s. w., von welchem sie dann wieder in zwei Schalen Xylol befreit werden. Die Gewebsfärbung durch Methylgrün tritt erst nach der Übertragung in ätherisches Öl und Xylol ein; sollte sie zu schwach hervortreten, so bringt man die Schnitte aus dem Xylol wieder in das Methylgrün-Anilinöl-Gemisch für einige Minuten zurück, bis die gewünschte Färbung erreicht ist. S. auch die I. Modifikation *Kühnes* der Gramschen Färbung.

Dreifache Färbung von tuberkelbacillenhaltigen Gewebsschnitten nach *Kühne*. Zarte Färbung in *Delafields* Hämatoxylinlösung (zu 2000 cm³ konzentrierter wässriger Ammoniakalaunlösung werden 20 g in 125 cm³ absolutem Alkohol aufgelöstes Hämatoxylin gesetzt. Nachdem die Lösung 3–4 Tage an Luft und Licht gestanden, wird sie filtriert und mit 500 cm³ Glycerin und 505 cm³ Methylalkohol vermischt. Die Lösung bleibt nun so lange stehen, bis sie eine dunkle Färbung angenommen hat, worauf sie schließlich filtriert und in einem gut verschlossenen Glase aufbewahrt wird. Vor dem Gebrauche verdünnt man sie mit mehr oder weniger Wasser, je nachdem eine langsamere oder schnellere Färbung gewünscht wird. Schwächere Lösungen geben bessere Färbungen), einige Stunden, in viel Wasser vom Alaun befreit, in Alkohol entwässert und 10 Minuten in Carbofuchsin gefärbt. Nach Abspülung in Wasser folgt Ausziehen des Fuchsins in Fluoresceinalkohol, Abspülen in reinem Alkohol, Übertragung in ätherisches Öl und Xylol und schließlich einige Minuten in Auramin-Anilinöl (Auramin ist in Anilinöl sehr leicht löslich, so daß schon einige Tropfen einer konzentrierten Lösung davon mit dem 4–5fachen Volumen reinen Anilinöls versetzt zu Differenzierungs- und Nachfärbezwecken genügen) bis zu gelblichem Tone; schließlich abspülen in reinem Anilinöl, ätherischem Öl, Xylol, Balsam. Protoplasma gelb, Bacillen rot; die dunkle Kernfärbung verdeckt leicht einen Teil der Bacillen.

Kühne färbt außerdem Tuberkelbacillen in Geweben mit Kernschwarz z. Carbofuchsin und Methylgrün. Kernschwarz (*Grübler*, Leipzig) wird mit 3–4 Teilen Wasser verdünnt und damit die entwässerten Schnitte einige Minuten gefärbt, bis sie einen dunkelgrauen Ton angenommen haben. Dann abspülen in einer schwachen, wässrigen Lösung von Lithion carbonicum (6–8 Tropfen konzentrierter wässriger Lösung von Lithion carbonicum auf 100 cm³ Wasser; stärkere Lösungen können zur Ausziehung mit Kernschwarz überfärbter Schnitte dienen) bis der Schnitt einen schwach grauen Farbenton aufweist. Abspülen in reinem Wasser, entwässern (5 Minuten) in Alkohol, färben in Carbofuchsin 10 Minuten, abspülen in Wasser, differenzieren in Fluoresceinalkohol, auswaschen in reinem Alkohol und übertragen in Methylgrün-Anilinöl auf 5 bis 10 Minuten. Es ist gut, letzteres nicht zu konzentriert zu verwenden; zwei Tropfen der konzentrierten Lösung in ein Blockschälchen mit reinem Anilinöl genügen zur Färbung. Die Methylgrünfärbung erfolgt auch hier erst nach der Übertragung in ätherisches Öl und Xylol. Tuberkelbacillen rot, Kerne und Protoplasma in verschiedenen Tönen von Blaugrün in zarter Gewebsdifferenzierung.

Methode von *Ziehl-Neelsen*. Wie nach *Koch-Ehrlich*, bloß statt des Anilinfarbstoffes das haltbarere und bequemere Carbofuchsin.

Schmorls Methode. Überfärben mit Hämatoxylin 20–31 Minuten, Wasser $\frac{1}{2}$ Stunde, Carbofuchsin $\frac{1}{2}$ –1 Stunde bei 37°; entfärben in 1%igem Salzsäurealkohol 1 Minute, 70%igem Alkohol 2–3 Minuten, Wasser, Lithion carbonicum-

Lösung (1 Teil konzentrierter wässriger Lösung auf 10 Teile Wasser) bis die Schnitte blau werden, Wasser, Alkohol absol., Xylol, Zedernöl.

Cimmino u. Paladino Blandini geben nach Vorfärbung mit *Ziehlschem* Carbolfuchsin die Schnitte auf 4 Minuten in ein Gemenge von *Hansens* Hämatoxilin und 8% HNO_3 aa., dann auf 5 Minuten in Leitungswasser (die gelblichen Schnitte werden violett), dann in dünne Lösung von Lithion carbonicum (die Schnitte werden blau), Alkohol (70%, 95% und absolut), Xylol, Balsam.

Roloff: Färbung in *Ziehls* Carbolfuchsin, Entfärbung in *Ebners* Flüssigkeit, Alkohol von 70%, essigsäure Vesuvinslösung mehrere Stunden, Wasser, Alkohol und Färbung nach *Weigert* (Kerne braun, Tuberkelbacillen rot, andere Bakterien blau).

Dreyer: Färben in 1%iger wässriger Lösung von Methyl- oder Gentianaviolett bei 36° $\frac{1}{2}$ —1 Stunde, Aq. destill. abspülen, konzentrierte wässrige Pikrinsäure 3—4 Minuten, trocknen mit Filtrierpapier, Anilinöl mit 1% Pikrinsäure, bis die Schnitte graugelb werden und keine violette Farbe mehr abgeben, Aq. destill., *Delafields* Hämatoxilin 5—8 Minuten, Aq. destill., Kontrastfärbung in *Hansens* Lösung (Pikrinsäurefuchsin 2—3 cm^3 + 1 gtt. 1%ige Essigsäure) 3 bis 5 Minuten, entwässern, aufhellen, einbetten. (Bakterien tief dunkelblau, Kerne braun, Protoplasma und Erythrocyten gelb, Bindegewebe rot.)

Nach *Unna u. Delbanco*: Färben mehrere Stunden oder eine Nacht mit *Ziehls* Carbolfuchsin, entfärben in 25%igem H_2SO_4 und 80%igem Alkohol, einlegen in 33 $\frac{1}{2}$ %ige Tanninlösung mit Orange oder Wasserblau gesättigt 5 Minuten, Aq. destill., leicht angesäuertes Wasser, 80%iger Alkohol, Alkohol absol., Xylol, Balsam.

Zur Färbung seiner Granula gibt *Much* drei Modifikationen der *Gramschen* Methode an, von denen folgende die gebräuchlichste ist:

Färben in Methylviolett BN gesättigt alkoholischer Lösung 10 cm^3 + 2%iges Carbolwasser 100 cm^3 durch 24—48 Stunden bei 37°, beizen in Kal. jodat. 5:0 + 2%iger Wasserstoffsuperoxydlösung 100 cm^3 2 Minuten, differenzieren in Alkohol absol., trocknen, Balsam.

Um Tuberkelbacillen neben *Muchschen* Granula darzustellen dienen die Methoden:

Von *Wehrli u. Knoll*. In der Wärme färben in (Stammlösung I: Methylviolett BN gesättigt alkoholische Lösung 10 cm^3 + 2%iges Carbolwasser 100 cm^3 und Stammlösung II: Fuchsin tabl. 1 g, Alkohol absol. 10:0, Aq. destill. 100:00, beide Stammlösungen aa. und filtrieren) 4 Minuten, jodieren wie oben, differenzieren in 1—2%igem salzsauren Alkohol, bis nicht nur rote, sondern auch blaue Farbwolken aufsteigen, absoluten Alkohol mehrfach wechseln, Xylol, Balsam.

Von *Hatano*: Färben in der Wärme mit Carbolfuchsin, waschen in Wasser, differenzieren in 25%iger Schwefelsäure 10—30 Sekunden, ausdifferenzieren bis zur Farblosigkeit in 75%igem Alkohol, färben mit Methylenblaulösung 2 Minuten, auswaschen, färben in der Wärme mit Anilinwasser-Gentianaviolett, waschen, jodieren mit Jodjodkalilösung 3—10 Minuten, mit Filtrierpapier abtrocknen, entfärben und entwässern in Alkohol absol., Xylol oder Toluol, Balsam.

Von *Weiß*: Färben in einem Gemenge von Anilinwasser-Methylviolett-Lösung und Carbolfuchsin 1:3, auswaschen, *Lugolsche* Lösung 5 Minuten, differenzieren in 5%iger Salpetersäure 1 Minute, in 3%iger Salzsäure 10 Minuten, entfärben in Aceton + Alkohol absol. aa. bis keine Farbe mehr entweicht, abtrocknen mit Filtrierpapier, nachfärben mit 1%iger Safraninlösung 5—10 Sekunden, abspülen in Wasser, trocknen, Xylol, Balsam.

Zur Darstellung der streptothrixartigen Wachstumsformen des Tuberkelbacillus eignet sich die Methode von *Friedrich u. Nöske*:

Färben in der Wärme mit Viktoriablaulösung (gesättigte absolut alkoholische Viktoriablaulösung 10 cm^3 , 33%iger Alkohol 80 cm^3 , Anilinöl 1 cm^3) einige

Minuten, *Lugolsche* Lösung 2 Minuten, auswaschen 30 Sekunden, kurz abspülen in 80%igem Alkohol, bis zur völligen Entfärbung in reinem Anilinöl differenzieren, abspülen in Alkohol, dann in Wasser, färben in Eosinlösung (wasserlösliches Eosin 2'0 g, Aq. destill. 100'0 cm³) 2 Minuten, abspülen in Wasser, färben in alkalischer Methylenblaulösung (gesättigte wässrige Lösung von Lithion carbonicum 5 cm³, Aq. destill. 80'0 cm³, Spirit. vin. rectificat. 10'0 cm³, gesättigte absolute alkoholische Lösung von Methylenblau 2 cm³) ¹/₂—1 Minute, abspülen in Wasser, färben in saurer Methylenblaulösung (gesättigte absolut alkoholische Methylenblaulösung 5 cm³, Aq. destill. 200'0 cm³, Eisessig 10 gtt.) 5—10 Minuten, entwässern in Alkohol absol., Xylol, Balsam.

2. Für B a c. l e p r a e:

Methode v. *Baumgarten*. Färben mit verdünnter Fuchsinlösung (5 gtt. der gesättigten alkoholischen Lösung auf 5 cm³ Wasser) 5—7 Minuten, differenzieren in Salpetersäure + Alkohol absol. (1:10) ¹/₄ Minute, auswaschen, färben mit verdünnter, wässriger Methylenblaulösung 15 Minuten, abspülen in Wasser, abtrocknen mit Filtrierpapier, Xylol, Balsam.

Marzinowsky schlägt vor: 2—3 Minuten in *Ziehlscher* Lösung mit 2 Teilen Wasser verdünnt färben, sorgfältig spülen, ¹/₂—2 Minuten nachfärben in *Löfflers* Methylenblau, dann Alkohol absol., Xylol, Balsam. Tuberkelbacillus ungefärbt, Leprabacillus rot.

3. Für K o k k e n:

in der Haut empfiehlt *Unna*: Kernfärbung mit Pikrocochenille, dann Färbung der Kokken mit Boraxmethylenblau nach *Sahl* (5%ige wässrige Boraxlösung 16 Teile, konzentrierte wässrige Methylenblaulösung 20 Teile, Wasser 24 Teile) 2 Minuten. Differenzierung nach drei Methoden. Die gefärbten Schnitte werden 1. in Wasser abgespült, dann in wässrige Arsensäurelösung eingetragen, dann Alkohol. Diese Entfärbung wird 1—3mal wiederholt bis die Abscesse nur noch schwach gefärbt sind, dann Bergamotteöl und Balsam. 2. in Eisensulfatlösung auf 10—30 Sekunden eingetragen, dann Alkohol, 1—5%ige Kaliumbioxalatlösung ¹/₂—2 Minuten, Alkohol, Öl, Balsam. 3. in ein Schälchen mit Alkohol, dem einige Tropfen Spirit. saponat. kalin. (*Hebra*) zugesetzt sind, dann Alkohol, Öl, Balsam. Nach der folgenden Chrommethode werden zwar die Eitererreger in der Hornschicht nicht dargestellt, wohl aber jene im Eiterherd. Nach Vorfärbung der Schnitte (rot und blau) kommen sie einige Sekunden in eine 1%ige Lösung von Kaliumbichromat, werden in Alkohol abgespült und längere Zeit in Anilinöl entfärbt, Bergamotteöl, Balsam.

B o t r y o m y k o s e:

Nach *Eber*: Färben mit 1%iger wässriger Eosinlösung, in Alkohol kurz auswaschen, Kernfärbung mit Hämatoxylin, Alkohol, Nelkenöl, Balsam.

G o n o k o k k e n:

Bumm empfiehlt Färbung mit konzentrierten Lösungen von Methylviolet in Toluidin oder Anilinwasser etwa ¹/₂ Stunde, dann vorsichtig entfärben und entwässern in Alkohol. — *Kühnes* Carbolmethylenblaumethode eignet sich auch.

Touton empfiehlt: Färbung mit Carbofuchsin 10—15 Minuten; differenzieren in Alkohol absol., Bergamotteöl, Kanadabalsam.

Jadassohn empfiehlt: Boraxmethylenblau und Differenzierung mit Alkohol absol. eventuell mit etwas HCl-Zusatz, oder in destilliertem Wasser mit einigen gtt. Essigsäure 1—2 Minuten, abspülen in Alkohol absol., Xylol, Balsam.

4. Für B a c. a n t h r a c i s und andere gegen Farbstoffe ähnlich sich verhaltende Bakterien empfiehlt *Kühne* eine Doppelfärbung mit Kernschwarz, wodurch ein sicheres Hervortreten der Kerne erzielt wird.

Vorfärbung mit Kernschwarz (5 Minuten färben in Carbolschwarzbraun [der Frankfurter Anilinfabrik] analog dem Carbofuchsin hergestellt), abspülen in

Lithionwasser. Auch Hämatoxylinvorfärbung zulässig. Die in Alkohol entwässerten Schnitte werden 3—5 Minuten in Carbolfuchsin gefärbt, in Wasser abgespült, einen Moment in Alkohol eingetaucht und in Methylgrün-Anilinöl differenziert, 15 Minuten bis 2 Stunden, je nach Schnittdicke und Intensität der Färbung, bis der Schnitt Methylgrünfärbung angenommen hat, dann ätherisches Öl und Xylol. Außer Methylgrün-Anilinöl kann auch Säureviolett-Anilinöl verwendet werden. Eine Modifikation dieser Methode besteht darin, daß die in Carbolfuchsin gefärbten Schnitte in Fuchsinalkohol entwässert und nach Übertragung in ätherisches Öl und Xylol in Auramin-Anilinöl differenziert werden. Ein analoges Verfahren läßt sich auch bei Methylenblaufärbung anwenden. Manche Bakterien der Milzbrandklasse halten nach einer sehr intensiven Färbung mit Carbolfuchsin ($\frac{1}{2}$ —2 Stunden) auch dem Fluoresceinalkohol gegenüber den Farbstoff fest, was die Differenzierung gelegentlich sehr erleichtert. Wenn es also auch gelingt, durch sehr lange Färbung mit Carbolfuchsin nicht zur Tuberkelbacillengruppe gehörige Bakterien so intensiv zu färben, daß sie selbst durch längere Ausziehung mit Fluoresceinalkohol nicht entfärbt werden, so tritt dies doch nicht ein, wenn man das Carbolfuchsin nur wenige Minuten einwirken läßt. Färbt man aber mit Schwarzbraun vor (wie oben, nach abspülen in Lithionwasser, entwässern in Alkohol, färben mit Carbolfuchsin 5 Minuten, differenzieren mit Fluoresceinalkohol), so wirkt dieses allem Anscheine nach als Beize und die Fuchsinfärbung der Bakterien widersteht nicht allein dem Fluoresceinalkohol, sondern sie ist sogar viel intensiver als sonst. Schwarzbraun färbt die Bakterien nur ganz schwach.

5. Für *Bac. mallei*:

Die Rotzbacillen lassen sich in Gewebsschnitten nur außerordentlich schwer deutlich tinktoriell darstellen. *Unna* gibt hierfür als Ursache an, daß das in der Rotzpustel außerordentlich reichlich vorhandene freie Kernchromatin den Farbstoff weit besser annimmt und festhält als die Bacillen. *Kühne* gibt folgende Methode der Färbung an:

Auswässern der Schnitte zur Befreiung von Alkohol, Färbung mit Carbolmethylenblau 3—4 Minuten, entfärben in salzsaurem Wasser einige Sekunden, gründliches Abspülen in Wasser, entwässern durch Aufdrücken mehrfach zusammengelegten Filtrierpapiers, Anilinöl zu 20% mit Terpentinöl versetzt, 8 bis 10 Minuten, Terpentinöl, Xylol, Balsam.

Eine Doppelfärbung erzielt er dadurch, daß die gefärbten Schnitte aus dem Xylol in ein Blockschälchen mit Terpentinöl übertragen werden, dem 5 Tropfen Safranin- oder (besser) 2 Tropfen Auramin-Anilinöl zugesetzt sind.

Nicoll kommt mit seiner Tanninmethode auch zu befriedigenden Resultaten.

Unna legt Gewicht auf die Antrocknung der Schnitte auf dem Objektträger. Zu diesem Zwecke werden die Schnitte ungefärbt aus Alkohol auf den Objektträger gebracht, mit Wasser bedeckt, sogleich mit Filtrierpapier wieder abgetrocknet und überdies noch an der Luft eintrocknen gelassen, was etwa $\frac{1}{2}$ Minute dauert. Dann überfärbt er auf dem Objektträger mit Methylenblau oder mit basisch Blau (man wägt ein Stück Natrium- oder Kaliumhydroxyd auf einem Blatt Papier ab und läßt es vom Papier in ein Kölbchen gleiten und stellt durch Aufgießen der entsprechenden Menge auf seine Neutralität geprüften Wassers eine 10%ige Lösung her). Wegen der Wasser anziehenden Kraft des Hydroxyds ist die Wägung rasch vorzunehmen, das Kölbchen mit einem gutschließenden Stöpsel zu versehen, der überdies noch mit Paraffin überzogen wird. Von dieser Stammlösung wird eine Verdünnung 1:10.000 hergestellt. Zu 100 cm^3 dieser Hydroxydlösung werden 30 cm^3 konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung zugesetzt, gut gemischt und filtriert (*Löfflers* Methylenblau oder basisch Blau, Rezept nach *Heim*, Lehrbuch der bakteriologischen Untersuchung und

Diagnostik, Stuttgart 1894, S. 33) oder mit *Kühnes* Carbolmethylenblau, oder mit der zusammengesetzten *Unnaschen* Lösung $\frac{1}{2}$ Stunde, dann abspülen in Wasser, wobei der Schnitt sich vom Objektträger löst, entfärben mit Glycerin-Äther-Mischung einige Sekunden oder 1%iger Arsensäure 5–10 Minuten, abspülen mit Wasser. Bei ungenügender Entfärbung durch die Glycerin-Äther-Mischung ist dieser Turnus zu wiederholen, dann entwässern in Alkohol absol., aufhellen in Terpentinöl, einschließen in Balsam.

Doppelfärbungen: mit Säurefuchsin von 1% über Nacht färben, abspülen in Wasser, antrocknen, färben wie oben, differenzieren in Arsensäure u. s. w. oder nach der Methylenblaufärbung 10 Minuten mit Wasser spülen, färben mit einer Mischung von konzentriert wässriger Tanninlösung und 1%iger Säurefuchsinlösung aa. 15 Minuten, dann Alkohol, Bergamotteöl, Balsam.

Methode von *Noniewicz*: Schnitte aus Alkohol in *Löfflers* Methylenblaulösung 2–5 Minuten, abspülen in Aq. destill., entfärben in Mischung von 75 Teilen $\frac{1}{2}$ %iger Essigsäure und 25 Teilen $\frac{1}{2}$ %iger wässriger Lösung von Tropäolin 00, dünne Schnitte nur rasch untertauchen, dicke 2–5 Sekunden und länger darin belassen, waschen mit Aq. destill. oder auswässern; ausbreiten des Schnittes auf dem Objektträger, absaugen des Wassers mit Filtrierpapier, trocknen des Präparates an der Luft oder über der Spiritusflamme, aufhellen in Xylol möglichst lange, Balsam, Rotzbacillen tief schwarz auf mehr oder weniger blauem Grund.

Löffler: Einige Minuten alkoholischer Methylenblaulösung, abspülen in Essigsäure-Tropäolin 00-Lösung, Alkohol, Zedernöl, Balsam. In alkoholischer Gentianaviolett-Anilinwasser-Lösung müssen die Schnitte $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$ Stunde gefärbt werden, ebenso in Fuchsinlösung. Besser als Essigsäure-Tropäolin 00-Lösung ist: 10 cm³ Aq. destill. + 2 gtt. konzentrierte schwefelige Säure + 1 gtt. 5%ige Oxalsäure. Dauer der Differenzierung etwa 5 Sekunden.

Preusse: *Longsches* Gemisch (konzentrierte alkoholische Methylviolettlösung und Xylol aa. mit 0.01% KHO alkalisch gemacht) an Stelle der alkalischen Methylenblaulösung (*Löffler*).

6. Für *Bac. pestis bubonicae*:

Albrecht u. *Ghon* empfehlen polychromes Methylenblau (*Unna*) mit und ohne Differenzierung in Glycerin-Äther-Mischung.

Kossel u. *Overbeck* geben folgende Methode der Doppelfärbung an:

Konzentrierte wässrige Lösung von Methylenblau medicinale Höchst mit der 10fachen Menge Aq. destill. verdünnt; auf jeden cm³ dieser Stammlösung 3 gtt. 5%ige wässrige Sodalösung (krystallisierte Soda). Unter Schütteln wird 1%ige wässrige Lösung Eosin BA extra Höchst tropfenweise zugesetzt, so daß auf 1 cm³ der Stammlösung 0.5–1.0 Eosinlösung kommt. Niederschlag darf nicht auftreten. Mit dieser Farbe werden die Schnitte 2 Stunden gefärbt, kurz in Wasser abgespült, in stark verdünnter Essigsäurelösung bis zum Eosinton differenziert, in Wasser ausgewaschen, mit 70%igem und Alkohol absol. entwässert, Xylol, Balsam.

7. Für *Bac. influenzae*:

Die Schnitte werden mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde in der 10–20fach verdünnten Lösung von Carbofuchsin überfärbt und in ganz schwach mit Essigsäure versetztem Alkohol differenziert. Hierbei geht die schwarzrote Färbung in einen rot-violetten Farbenton über, worauf die Aufhellung in Xylol erfolgt.

8. Für *Bac. typhi abdominalis* empfiehlt sich:

Härtung in Alkohol, Färbung mit verdünntem Carbofuchsin, Carbolmethylenblau oder *Löfflerschem* Methylenblau 3–30 Minuten. Für Typhusbacillen eignen sich auch die Methoden zur Darstellung des Rotzbacillus im Schnitt.

Bonhoffs Methode für *Bac. typhi*: Schnitt kommt aus Alkohol absol. auf den Objektträger, wird gewässert und in der Mitte des Glases fixiert. 4 gtt. kon-

zentrierte alkoholische Methylenblaulösung, 15 gtt. Ziehlsches Carbofuchsin und 20 cm³ Aq. destill. Mit diesem Farbstoff werden die Schnitte 2 Minuten kalt und dann unter leichtem Erwärmen bis Dämpfe aufsteigen gefärbt, dann Wasser und vorsichtige Differenzierung in 1%iger Essigsäure, Anilinöl-Xylol wie bei Weigerts Modifikation zum Entwässern und Aufhellen.

9. Für *Bac. scleromatis*, der mit Methylenblau nicht gut darzustellen ist:

Alvarez empfiehlt, die Gewebstücke vor der Alkoholfärbung in 1%iger Osmiumsäure zu fixieren.

Mibelli stellt ihn mit *Grenacherschem* Alauncarmin in 4%iger wässriger Lösung dar, Färbedauer etwa 1 Stunde, bis gute Kerntinktion eingetreten ist. Bei protrahierter Färbung 12—24 Stunden wird Differenzierung in salzsaurem Alkohol notwendig, dann abspülen in Wasser, Alkohol, Dammarlack.

Er färbt sich mit *Hämatoxylin*; Nachfärbung mit Eosin hat zu entfallen, da durch dieselbe die Bakterienfärbung verdeckt wird.

Nach Härtung in *Müllerscher* Flüssigkeit ist er auch nach der *Gramschen* Methode darzustellen.

10. Für den *Ducreyschen* *Bacillus* (*Ulcus molle*):

Unna gibt an: Härtung in Alkohol, überfärben der Schnitte mit basisch Blau in alter Lösung (Kalii carbonici 1:0, Methylenblau 1:0, Aq. destill. 100:0, Spirit. vin. 20:0, Misc. coque ad remanent. 100:00 adde Methylenblau 1:0, Boracis 1:0 in Aq. destill. 100:0 soluta misce. S. zusammengesetzte Methylenblaulösung) stark, bringt sie auf den Objektträger, trocknet rasch mit Filtrierpapier ab und gibt sofort einen Tropfen Glycerin-Äther-Mischung (*Schuchardt*, *Görlitz*) darauf, welcher in wenigen Sekunden entfärbt. Neuerlich abtrocknen mit Filtrierpapier, Alkohol bis zur vollständigen Entwässerung, Bergamotteöl, Balsam. Statt Glycerin-Äther-Mischung verwendet *Unna* auch *Styron* (*Styronzintalkohol* ist im *Styron* und *Perubalsam* enthalten und kristallisiert in feinen Nadeln). Zum histologischen Gebrauch ist auch die im Handel vorkommende dickflüssige Form zu verwenden. Die Flüssigkeit riecht eigenartig nach Mispeln, ist mit Wasser und Glycerin nicht, wohl aber mit Alkohol, Äther, ätherischen Ölen und auch mit Balsam mischbar.

Nach *Petersen* beeinträchtigt Alkohol die Färbung, er verwendet daher zur Entfärbung zunächst reines Anilinöl 3—10 Minuten, dann Anilin und Xylol aa. $\frac{1}{2}$ —3 Stunden.

Mit der *Nicolleschen* Tanninbehandlung (10%ige wässrige Tanninlösung) erhält er gute, bei blaßblauer Färbung weniger scharfe Resultate.

Kruse empfiehlt: *Löfflers* Methylenblau $\frac{1}{4}$ Stunde, Wasserspülen, mit Fließpapier abtrocknen, momentan in Alkohol eintauchen, wieder abtrocknen, Xylol, Balsam.

Schließlich empfiehlt *Unna* neuerdings die Rongalitweißmethode: Der unfixierte Gefrierschnitt wird einige Minuten mit Rongalitweiß (Methylenblau 0.2 g, Aq. destill. 10 cm³, 2 Tropfen 25%iger Salzsäure, Rongalit [*Grübler*] 0.3 g erwärmen, bis Entfärbung eintritt) behandelt, wobei zu beachten ist, daß dem Schnitte keine Luftblasen anhaften, was durch Hin- und Herschwenken mit der Glasnadel zu verhindern ist. Auswaschen in mehrmals gewechseltem, sauerstofffreiem (frisch aufgekochtem) Wasser, nachbläuen lassen in Wasser, übertragen auf den Objektträger und antrocknen lassen, einschließen in Balsam.

11. Für den *Nekrosebacillus* (*Bacillus necroseos*):

Jensen: Härtung in *Müllerscher* Flüssigkeit, färben in Toluidin-Safranin (hergestellt wie Anilinwasser-Gentianaviolett) einige Minuten, entwässern in konzentrierter alkoholischer Safraninlösung, Entfärbung in Fluorescein-Nelkenöl (gesättigte Lösung), Nelkenöl, Alkohol; Nachfärbung mit wässriger Methyl-

grünlösung, Alkohol, Xylol, Balsam. (Nekrosebacillen rot, Gewebe grün. Andere Bakterien lassen sich nach dieser Methode nicht darstellen.)

12. Für *Streptothrix actinomyces* eignet sich die Gramsche Methode mit Carminvorfärbung, durch welche die keulenförmigen Anschwellungen rot gefärbt werden.

Schlegel empfiehlt: Intensive Färbung der Schnitte in starker alkoholischer Eosinlösung 4—5 Stunden und auch länger, kurz abspülen in 96%igem Alkohol, Färbung in gewöhnlicher Hämatoxylinlösung 5—10 Minuten. Nicht stark wässern, rasch die Schnitte auf den Objektträger auflegen.

Methode nach *van Gieson*: Färben mit *Weigertschem* Eisenhämatoxylin (Lösung I: Hämatoxylin 1.0 g, 96%iger Alkohol 100 cm³; Lösung II: Liq. ferri sesquichlorat [σ 1, 124] 4 cm³, Aq. dest. 100.0 cm³, konzentrierte Salzsäure 1.0 cm³. Zum Gebrauche mischt man beide Lösungen aa.; die Mischung färbt am besten am 2. Tag) 1—5 Minuten, auswaschen in Wasser einige Minuten, eventuell differenzieren in salzsaurem Alkohol und dann waschen in Wasser, färben mit *van Giesons* Gemisch (Stammlösung: Säurefuchsin 1.5 g + gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung etwa 0.6% 150 cm³. Zum Gebrauch verdünnt man 10 cm³ dieser Stammlösung mit 100 cm³ gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung) 1 Minute, kurz durch Wasser durchziehen, entwässern in 96%igem Alkohol und Alkohol absol., Xylol, Kanadabalsam.

Modifizierte Gramsche Methode von *Schmorl*. Färben nach *Weigert-Gram* (Anilinwasser-Methylviolet, Jodieren, differenzieren in Anilinöl-Xylol), Alkohol absol. 2—3 Minuten, färben mit Säurefuchsin (3 gtt. konzentrierte wässrige Säurefuchsinlösung + 15 cm³ Wasser) 3 Minuten, waschen in Wasser 2 Minuten, Alkohol absol., Xylol, Balsam. (Mycel blau, Kolben rot. Kernfärbung kann mit Bismarckbraun vorgenommen werden.)

Methode von *Bostroem*: Färben in Anilinwasser-Gentianaviolett 10—15 Minuten, färben mit *Weigerts* Pikrocarmin 5—10 Minuten, gut auswässern, Alkohol absol., bis die Schnitte rotgelb werden, Organumöl, Balsam (Mycel blau, Kolben rot, Kerne rotgelb).

Methode von *Birch-Hirschfeld*: Färben in Hämatoxylin- oder Lithioncarminlösung, kurz wässern nach letzterem, länger nach ersterem, färben in 2%iger Krystallviolettlösung in der Wärme 5 Minuten, 0.5%ige alkoholische Pikrinsäurelösung $\frac{1}{2}$ —1 Minute, Alkohol absol. bis der Schnitt blaugrün wird $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Stunde, Organumöl mehrmals wechseln, Xylol, Balsam (Mycel blau, Kolben gelb).

Sata: Gefrierschnitte mit Hämatoxylin gefärbt, in Alkohol abgespült und 12—24 Stunden in konzentrierter alkoholischer (95%) Lösung von Sudan III gefärbt, Alkohol, Glycerin (Aktinomyces hellrot, Gewebe blau).

Viele Aktinomycesstämme färben sich auch nach der Methode der Tuberkelbacillenfärbung; auch *Nicolles* Carbolthionin gibt gute Resultate.

Will man die Kolben different färben, so bringt man die Schnitte vor dem Krystallviolett in Carbofuchsin, Anilinwasserfuchsin oder Anilinwassersafranin auf 5 Minuten, dann Alkohol u. s. w.

Für Streptotricheen im allgemeinen empfiehlt:

Buchholz: Stammlösung von gesättigter Lösung von Krystallviolett in Alkohol, dem vorher 20% Anilinöl oder nach *Kutscher* 20% Carbolsäure zugesetzt wurde, wird mit 5—10 Teilen Wasser verdünnt; man färbt damit 20 bis 30 Minuten, auch länger.

13. Für Hautpilze:

Methode von *Boeck*: Entfetten der Schuppen mit Ätheralkohol, färben mit Boraxmethylblau (5%ige wässrige Boraxlösung 16 Teile, konzentriert wässrige Methylblaulösung 20 Teile, Aq. destill. 40 Teile) $\frac{1}{2}$ bis mehrere Minuten, Wasser, dem einige Körnchen Resorcin zugefügt sind, $\frac{1}{2}$ —1 Minute, differenzieren in

Alkohol einige Minuten bis 1 Stunde, eventuell entfärben in schwacher Lösung von Wasserstoffsuperoxyd einige Sekunden, Alkohol absol., Xylol, Balsam.

Methode von *Unna*: Hautschuppen mit Eisessig befeuchten, zwischen Objektträgern verreiben und mit Alkoholäther entfetten. Färben mit Boraxmethylenblau (Borax 1:0, Methylenblau 1:0, Aq. destill. 100:0) $\frac{1}{2}$ —5 Minuten, Wasser, Xylol, Balsam. Zur Differenzierung eventuell *Unnas* Glycerin-Äther-Mischung.

Methode von *Malcolm Morris*: Entfetten mit Ätheralkohol. färben mit 5%iger Methylviolettlösung in 70%igem Alkohol 5—30 Minuten, *Lugolsche* Lösung 1 Minute, trocknen, differenzieren mit Anilinöl, dem 2—4 gtt. Salpetersäure zugesetzt sind, waschen in Anilinöl, Xylol, Balsam.

14. Für Blastomyceten:

Methode von *Busse*: Färben mit Hämatoxylin, waschen in Aq. destill., färben in schwacher Carbofuchsinlösung (1:20) $\frac{1}{2}$ bis mehrere Stunden, 96%iger Alkohol, Alkohol absol., Xylol, Balsam. (Kerne blau, Hefen rot.)

15. Für Spirochäten sind von historischer Bedeutung jene Methoden, die Bakterien als Erreger der Lues nachweisen sollten. so die von:

Lustgarten färbte die Schnitte erst 12—24 Stunden bei Zimmertemperatur, dann noch 2 Stunden im Thermostaten bei 40° mit Anilinwasser-Gentianaviolett. Zur Entfärbung diente eine 1:5%ige wässrige Lösung von Kaliumpermanganat (10 Sekunden) und hierauf eine wässrige Lösung von reiner schwefeliger Säure. gewonnen durch Behandlung von metallischem Kupfer mit Schwefelsäure. Dann abspülen in Wasser, nochmaliges Einlegen in die Kaliumpermanganatlösung diesmal auf 3—4 Sekunden, sowie in die schwefelige Säure u. s. w., bis der Schnitt farblos wurde. Entwässern in Alkohol, aufhellen in Öl, einschließen in Xylol, Kanadabalsam.

Gottstein wandte die Methode von *Giacomi* auf Schnitte an. 24 Stunden färben mit Fuchsin, abspülen in Aq. destill., übertragen in reine oder verdünnte Eisenchloridlösung, Alkohol, Nelkenöl, Xylol, Balsam. Die Schnitte sind gleichmäßig hellviolett gefärbt, ihre Kerne farblos, vorhandene Bacillen oft nicht rot, sondern dunkelviolet.

Doutrelepoint u. *Schütz* haben Bacillen inluetischen Produkten 20 bis 48 Stunden in 1%iger wässriger Lösung von Gentianaviolett vorgefärbt, in verdünnter Salpetersäure (1:15 Wasser) wenige Sekunden entfärbt, in absolutem Alkohol eingelegt, mit schwacher, durchsichtiger, wässriger Safraninlösung einige Minuten unterfärbt, dann in 60%igen, absoluten Alkohol, Zedernöl eingelegt und in Balsam eingebettet. *Lewy* zieht dem Gentianaviolett Carbofuchsin vor und *Fordyce* die *Kühnesche* Krystallviolettlösung.

Zur Darstellung des *Spirochaete pallida* dienen:

Originalmethode nach *Levaditi*: Fixieren kleiner Gewebsstückchen in 10% Formol 24 Stunden, 96% Alkohol 24 Stunden, Aq. destill. bis die Stücke zu Boden sinken, in dunkler Flasche bei 36° versilbern mit $\frac{1}{2}$ —3%iger wässriger Lösung von Argent. nitric. 3 Tage, kurz wässern in Aq. destill., Reduktion in dunkler Flasche vor Licht geschützt mit: Acid. pyrogall. 4:0, Aq. destill. 100:0, 40%iges Formol 5:0 24—48 Stunden, wässern, einbetten in Zelloidin oder Paraffin.

Methode von *Nikiforoff*: Fixieren in 5%iger wässriger Kaliumbichromatlösung und gesättigter Sublimatlösung in physiologischer Kochsalzlösung a. a. nachhärten in aufsteigendem Alkohol, Paraffineinbettung, färben in: konzentrierter wässriger Methylenblaulösung 10:0, 1%iger alkoholischer Tropäolinlösung 5:0, 1%iger Kaliumhydroxydlösung 2 gtt. 24 Stunden, wässern, Alkohol absol. und Äther a. a., Bergamottöl, Xylol, Balsam.

Methode von *Bertarelli* u. *Volpino*: Kleine Stücke in Alkohol fixieren; 3 bis 4 Tage in folgender Lösung: Arg. nitric. 1:5, Aq. destill. 50:0, 96%iger Alkohol 50:0, reine Essigsäure 4—5 gtt., sobald Niederschläge auftreten Flüssigkeit erneuern.

Mehrfaches Auswaschen in Aq. destill. In *Van Ermengens* Reduktionsflüssigkeit (Tannin 3·0, Gallussäure 5·0, essigsaures Natron 10·0, Aq. destill. 350·0); bei Trübung wechseln. Auswaschen in Aq. destill., Alkohol, Chloroform, Paraffineinbettung.

Modifikation nach *Levaditi*: Fixierung in 10%iger Formalinlösung 24 bis 48 Stunden. Härtung in 96%igem Alkohol 12—16 Stunden. Waschen in Wasser, bis die Stücke zu Boden sinken. Versilberung mit: Solut. arg. nitric. 1·5:100·0 Aq. dest. der im Moment des Gebrauches Pyridin 10:100 Wasser zugesetzt wird in Flaschen mit Glasstöpsel (!) 2—3 Stunden bei Zimmertemperatur, dann 4—6 Stunden bei 50°, kurz in Pyridin 10:100 Wasser waschen. Dann Sol. acid. pyrogall. 4:100 Wasser, dem im Moment des Gebrauches Aceton 10:100 und Pyridin 15:100 zugesetzt wird mehrere Stunden. Alkohol, Xylol, Paraffineinbettung.

Oder auch:

Fixieren dünner Gewebsscheiben in 10%igem Formalin 24 Stunden und länger: 96%iger Alkohol 24 Stunden; Aq. destill. bis zum Untersinken der Stücke; einlegen in 90 cm³ 1·5%ige Silbernitratlösung, der unmittelbar vor dem Gebrauche 10 cm³ reines Pyridin zugesetzt wurde (dunkle Flasche!); 2—3 Stunden bei Zimmertemperatur, dann 4—6 Stunden bei 50°; rasch abwaschen in reinem Pyridin; übertragen in eine Mischung von 15 cm³ Pyridin mit 85 cm³ einer unmittelbar vor dem Gebrauche hergestellten Pyrogallussäure-Aceton-Mischung (4%ige Pyrogallussäurelösung 90 cm³, reines Aceton 10 cm³); steigender Alkohol; rasche Paraffineinbettung.

Modifizierte *Levaditi*-Methode von *Noguchi* (für Zentralnervensystem): Härtung in 10% Formalin; Scheibchen von 5—7 mm Dicke werden eingelegt in eine Mischung von konzentriertem Formalin 10 cm³, Pyridin 10 cm³ Aceton 25 cm³, Alkohol 25 cm³, Aq. destill. 30 cm³ und bleiben darin 5 Tage; auswaschen in Aq. destill. 24 Stunden; 96%iger Alkohol 3 Tage; auswaschen in Aq. destill. 24 Stunden; 1·5%ige Silbernitratlösung 3 Tage bei 37° oder 5 Tage bei Zimmertemperatur; auswaschen in Aq. destill. 2 Stunden; 4%ige Pyrogallussäurelösung, der man 5% Formalin zugesetzt hat, 24—48 Stunden bei Zimmertemperatur; gründlich auswaschen in Aq. destill.; 80%iger Alkohol 24 Stunden; 95%iger Alkohol 3 Tage (täglich erneuern); absoluter Alkohol 2 Tage; Xylol; Xylol-Paraffin. Einbetten.

Andere Modifikation *Levaditis*: Formalin- und Alkohohlärtung, 1·5% Solut. arg. nitr. 3 Tage bei 38°, dann 24 Stunden bei Zimmertemperatur in einer Lösung von Pyrogallussäure 2·0, Formol 5·0, Aq. dest. 100·0 zur Reduktion; dann Alkohol, Xylol, Paraffineinbettung.

Zur Färbung der *Recurrentispirochaete* empfiehlt *Soudakewitch*:

Fixierung in *Müllerscher* Flüssigkeit oder Alkohol; Vorfärbung der Schnitte mit Boraxcarmin und nach *Orth* in einem Gemisch von 30 Teilen Wasser, 70 Teilen Alkohol, 1 Teil Salzsäure differenzieren. Auswaschen in Wasser; färben in verdünnter Methylenblaulösung: auf ein Uherschälchen Aq. destill. 3—4 gtt. einer Lösung von Methylenblau in 5% Acid. carbol. Rasches Abspülen in mit Methylenblau gefärbtem Alkohol von 95%, klären in gefärbtem und dann ungefärbtem Anilinöl, dann Zedernöl, Balsam.

Levaditi-Schnellmethode nach *Reye*:

Kleine Gewebstücke werden im Paraffinschranke bei 57° wie folgt behandelt: 10%iges Formalin 10 Minuten; 96%iger Alkohol 30 Minuten; Aq. destill. 10 Minuten; 1·5%ige Silbernitratlösung 45 Minuten; Mischung von: Pyrogallussäure 3·0 g, 10%iger Formalinlösung 5·0 cm³, Aq. destill. ad 100·0 cm³ 45 Minuten; 96%iger Alkohol 20 Minuten; Aceton 20 Minuten; Paraffineinbettung 60 Minuten (Gesamtdauer der Methode 4 Stunden).

Für die *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*: s. *icterogenes* eine der oben angeführten Methoden der *Levaditi*-Färbung.

16. Für die *Negrischen* Körperchen bei *Lyssa*:

Henke u. *Zeller* empfehlen Acetonfixierung kleiner Stücke aus dem Ammons-horn 30–45 Minuten bei 37°, dann Paraffineinbettung. Färbung nach *Mann*: Eosinmethylblaulösung (35 cm³ 1%iges wässriges Methylblau [nicht wie in den meisten Büchern angegeben Methylenblau], 35 cm³ 1%ige wässrige Eosinlösung, 100 cm³ Aq. destill.) rasch in Wasser und Alkohol absol. abspülen, dann in Alkohol absol. mit 5 gtt. 1%iger Lösung von Natrium hydroxydatum in Alkohol absol. versetzt. Abspülen in Alkohol absol., in Wasser 1 Minute, in Wasser mit etwas Essigsäure leicht angesäuert 1–2 Minuten, rasche Entwässerung in Alkohol absol. und eventuell Aceton, Xylol, Balsam.

Methode von *Lentz*: Härten in Aceton $\frac{1}{2}$ – $\frac{3}{4}$ Stunde bei 37°, einbetten in Paraffin, färben mit Eosin extra B Höchst 0·5, 60%igem Alkohol 100·0 1 Minute, wässern, färben mit gesättigter alkoholischer Lösung von Methylenblau B pat. Höchst 30·0 und 0·01%iger wässriger Kalilauge 100·0 1 Minute, Wasser, trocknen mit Filtrierpapier, differenzieren in Alkohol absol., der auf je 30 cm³ 5 gtt. 1%ige absolut alkoholische Natronlauge enthält, bis die Schnitte blaßrosa erscheinen, differenzieren in Alkohol absol., der auf je 30 cm³ 1 gtt. 50%ige Essigsäure enthält, kurz abspülen in Alkohol absol., Xylol, Balsam. (Negrikörper rot, ihr Innenkörper blau, rote Blutkörperchen zinnoberrot, Kerne hellblau, Kernkörperchen schwarzblau.)

Methode von *Stutzer*: Härten und einbetten wie nach *Lentz*, färben in *Löfflers* Methylenblau in Aq. destill. bis zur Durchsichtigkeit gelöst 5–15 Minuten. differenzieren in 1%iger Tanninlösung 2–5 Minuten, Wasser, Alkohol, Xylol. Balsam. Zur Darstellung der *Negrischen* Körper eignen sich auch die oben angeführten verschiedenen Methoden der *Giemsa*-Färbung.

Ferner das Eisenhämatoxylinverfahren von *Benda-Heidenhain*: Fixieren in Sublimat oder Formalin; die Schnitte für 24 Stunden in offiz. Liq. ferri sulf. oxyd., der mit 2 Teilen Aq. destill. verdünnt ist; auswaschen erst in destilliertem. dann in Leitungswasser, färben in 1%iger wässriger Hämatoxylinlösung bis die Schnitte tiefschwarz sind, auswaschen in Wasser, differenzieren in 5–30%iger Essigsäure, auswaschen in Wasser, entwässern in steigendem Alkohol: Xylol. Balsam.

Borrel empfiehlt seine Färbung mit Magentarot und Pikroindigocarmin: Fixation in einem Gemisch von folgender Zusammensetzung: Acid. osmic. 2·0 g, Acid chromic. 3·0 g, Platinchlorid 2·0 g, Acid acetic. 20·0 cm³, Aq. dest. 350·0 cm³. Färbung der Schnitte in einer wässrigen Lösung von Magentarot mit oder ohne Carbolzusatz 10–15 Minuten bei 50°, abspülen mit Wasser. Behandlung durch 5 Minuten mit Pikroindigocarminlösung (gesättigte Indigocarminlösung 2 Teile, gesättigt wässrige Pikrinsäurelösung 1 Teil), abspülen mit Wasser kurze Zeit. Alkohol, Xylol.

Schließlich *Pappenheims* Panchromverfahren: Fixieren in *Orthschem* Gemisch. Einbetten in Paraffin. Schnitte eventuell nach kurzer Vorfärbung mit *May-Grünwald*- oder *Jenner*-Lösung in verdünnte Panchromlösung (10 Tropfen Panchrom [*Grübler*] auf 10 cm³ Aq. destill.) 20–25 Minuten, auswaschen in destilliertem Wasser, behandeln mit 0·1%iger wässriger Pikrinsäurelösung bis die Schnitte rot aussehen. gründliches Abspülen mit destilliertem Wasser, abtrocknen mit Filtrierpapier, eintauchen in ein Gemisch von Alkohol absol. 1 Teil, Aceton pur. 1 Teil, Xylol 6–7 Teile, abtupfen mit Filtrierpapier, nochmaliges Einlegen für längere Zeit in ein frisch bereitetes Alkohol-Aceton-Xylol-Gemisch von obiger Zusammensetzung, Xylol, Balsam.

17. Für die *Guarnierischen* Körper bei *Variola* s. die Färbungen für die *Negrischen* Körper.

18. Für Ruhr-Amöben empfiehlt Huebschmann die Bestsche Carminfärbung:

Fixation in absol. Alkohol, Paraffineinbettung. Vorfärben der Schnitte mit Hämalaun, differenzieren in Leitungswasser, färben in folgender Lösung 5 Minuten: filtrierte Carminlösung (Carmin 2.0 g, Kal. carbon. 1.0 g, Chlorkalium 5.0 g, Aq. destill. 60.0 cm³ einige Minuten kochen, dann 20.0 cm³ Liq. ammon. caustic. nach Erkalten zusetzen) 2 Teile, Liq. ammon. caustic. 3 Teile Methylalkohol 3 Teile; aus dieser Lösung sofort in die Differenzierungsflüssigkeit (Methylalkohol 40 cm³, Alkohol absol. 80 cm³, Aq. destill. 100 cm³) 3–5 Minuten, Alkohol, Xylol, Balsam.

19. Für die Rickettsia Prowazeki bei Typhus exanthematicus: Giemsa-Färbung.

Literatur: Benutzte Werke mit zusammenfassender Darstellung der Färbung von Bakterien in Geweben: *Behrens, Kossel* u. *Schiefferdecker*, Die Gewebe des menschlichen Körpers. Braunschweig 1899. — *Heim L.*, Lehrbuch der bakteriologischen Untersuchung und Diagnostik. Stuttgart. — *Herzheimer G.*, Technik der pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. Wiesbaden 1912. — *v. Kahlden-Gierke*, Technik der histologischen Untersuchungsmethoden. 8. Aufl. Jena. — *Marx E.*, Die experimentelle Diagnostik. Serumtherapie und Prophylaxe der Infektionskrankheiten. 3. Aufl. Berlin 1914. — *Neumann O. u. Mayer M.*, Atlas und Lehrbuch wichtiger tierischer Parasiten und ihrer Überträger mit besonderer Berücksichtigung der Tropenpathologie. 1914. — *Schmorl G.*, Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. Leipzig.

Spezielles Literaturverzeichnis: *Albrecht* u. *Ghon*, Denkschr. d. math.-naturw. Klasse d. K. Akad. d. Wissensch. LXVI, Wien 1898 u. 1900. — *Alvarez*, Baumgarten, pathologische Mykologie. Braunschweig. — *Baumgarten*, Zbl. med. Wissensch. 1882 u. Zt. f. wiss. Mikrosk. 1884, I. — *Bertarelli u. Volpino*, Zbl. f. Bakt. 1906, Orig. XLI; 1907, XLIII. — *Birch-Hirschfeld*, zit. nach Enzyklopädie d. mikrosk. Technik 1910. — *Blum F.*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1893, X. — *Boeck*, Forhandl. Norske Med. Selskab. Kristiania 1887. — *Bonhoff*, Mon. f. prakt. Dermat. XVIII, zit. nach Enzyklopädie d. mikrosk. Technik. 1910. — *Borrel*, zit. nach Kolle-Wassermann, VIII. — *Bostroem*, Zieglers Beiträge, IX u. IV. Kongr. f. inn. Med. Wiesbaden 1884. — *Buchholz*, Zt. f. Hyg. 1897, XXIV. — *Bumm*, Vortr. med.-phys. Ges. Würzburg 1888. — *Busse*, Die Hefen als Krankheitserreger. Berlin 1897. — *Cimmino e Paladino Blandini*, Ann. d'ig. sper. X. — *Claudius*, Ann. Past. 1897, XI. — *Cole*, zit. nach Enzyklopädie d. mikrosk. Technik 1910. — *Coronini C.*, Paraffinöl, Petroleum und Tetralin als Vorharze in der Einbettungstechnik. Wr. kl. Woch. 1921, S. 73. — *Czaplewski*, Hyg. Rundschau 1894, IV. — *Delbanco*, D. med. Ztg. 1899. — *Doutrelepont u. Schulz*, D. med. Woch. 1885. — *Dreyer*, Zbl. f. Bakt. 1900, XXVII. — *Eber*, D. Zt. f. Tiermed. 1892. — *Ehrlich P.*, D. med. Woch. 1882 u. Farbanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes 1891; Beiträge zur Theorie der Bacillenfärbung 1886. — *Fraenkel C.*, Grundriß der Bakterienkunde. Berlin. — *Fischer*, Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Kritische Untersuchungen über Technik und Theorie in der neuen Zellforschung. Jena 1890. — *Flemming*, A. f. mikrosk. Anat. 1877, XIII u. 1879, XVII; Zellsubstanz, Kern und Zellteilung. Leipzig 1882. — *Friedrich u. Noeske*, Zieglers Beiträge XXVI. — *Fordyce*, Zentralblatt für Bakteriologie. (Ref.) V. — *Giemsa G.*, D. med. Woch. 1909 u. 1910; Zbl. f. Bakt. 1910, Orig. LIV. — *Gierke*, zit. nach *Herzheimer*. — *van Gieson*, Laboratory notes of technical methods, New York med. J. 1889. — *Gram*, Fortschr. d. Med. 1884. — *Hamilton*, zit. nach Enzyklopädie d. mikrosk. Technik. 1910. — *Hatano*, zit. nach *Schmorl*, Untersuchungsmethoden. — *Helly K.*, Zt. f. wiss. Mikrosk. 1903, XX. — *Henke u. Zeller*, Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 1905, XVI. — *Hermann Fr.*, A. f. mikrosk. Anat. 1899, XXXIV. — *Huebschmann*, 8. Tagung d. f. Vereinigung f.

Mikrobiologie. Jena 1920. — *Israel*, Berl. kl. Woch. 1891. — *Jadassohn*, D. med. Woch. 1890. — *Jensen C. O.*, Erg. d. allg. Path. 1897, I. — *Koch R.*, Mitt. d. kais. Ges. 1881, I u. 1884, II u. Berl. klin. Woch. 1882. — *Kossel*, zit. nach *Schmorl*, Untersuchungsmethoden. — *Kossel* u. *Overbeck*, Arb. a. d. kais. Ges. 1901, XVIII. — *Kruse*, zit. nach *Schmorl*, Untersuchungsmethoden. — *Kühne H.*, Praktische Anleitung zum mikroskopischen Nachweis der Bakterien im tierischen Gewebe. Leipzig 1882; Zbl. f. Bakt. 1892, Orig. XI; Zbl. f. Bakt. 1892, Orig. XII. — *Lentz*, Zbl. f. Bakt. 1907 (Orig.), XLIV. — *Letulle*, zit. nach *Heim*. — *Levaditi*, Compt. rend. soc. biol. 1905 u. 1906. — *Lewy*, Zbl. f. Bakt. (Ref.) V. — *Löffler*, Mitt. d. kais. Ges. 1884, II u. 1886. — *Lustgarten*, Med. Jahrb. d. k. k. Ges. d. Ärzte in Wien. 1885. — *Malcolm Morris*, Monatsh. f. prakt. Derm. 1897, XXIII. — *Mann*, Verh. d. anat. Ges. Kiel 1898. — *Marzinowsky*, Zbl. f. Bakt. 1899, XXV. — *Mibelli*, Monatsh. f. prakt. Derm. XII. — *Much*, Berl. kl. Woch. 1908, Nr. 18. — *Müller H.*, Verh. d. phys.-med. Ges. Würzburg 1859, XVIII u. ges. hinterl. Schriften. 1859, I. — *Negri A.*, Zbl. f. Bakt. 1903, Orig. XLIII u. XLIV. — *Nicolle*, Compt. rend. soc. biol. 1904; Ann. Pasteur 1895, IX. — *Nikiforoff*, Enzyklopädie der mikroskopischen Technik 1910. — *Noniewicz*, D. Zt. f. Tiermed. u. vergl. Path. XVII. — *Orth*, Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 1902, XIII. — *Pappenheim*, Fol. haem. IX u. XIII. — *Pacinotti*, Gaz. degli ospedal. 1892. — *Parker* u. *Floyd*, Anat. Anz. 1895, XI. — *Petersen*, Zbl. f. Bakt. 1893, XIII. — *Pfeiffer R.*, D. med. Woch. 1892 u. Zt. f. Hyg. 1893, XIII. — *Pranter V.*, Zentralblatt für Path. 1902, XIII. — *Pregl F.*, Zbl. f. Bakt. 1891, X. — *Preusse*, Berl. tier. Woch. 1889. — *Reye*, Münchner medizinische Wochenschrift 1913, S. 2484. — *Roloff*, Arbeiten aus dem path. Institut Tübingen 1896, II u. Zbl. f. Bakt. XXI. — *Romanowsky*, St. Petersburger med. Woch. 1891. Deutsch: *Werner P.*, Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. St. Petersburg 1891. — *Sahli*, Lehrbuch der klinischen Untersuchungsmethoden. — *Sata*, Zentralblatt für allgemeine Pathologie. 1900. — *Schiefferdecker*, Archiv für mikroskopische Anatomie 1882: Zeitschrift für wiss. Mikroskopie 1884, I; 1888, V. — *Schlegel*, Kolle-Wassermann. Handb. d. Mikroorgan. 1903. — *Schridde H.*, Anat. Hefte 1905, XXVIII u. Zbl. f. path. Anat. 1905, XVI; Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. XVII. — *Soudakewitch*, Ann. Past. 1891, V. — *Sternberg C.*, Zbl. f. path. Anat. 1905, XVI. — *Tellyesniczky*, A. f. mikr. Anat. 1902, LX u. 1905, LXVI. — *Touton*, A. f. Derm. 1899. — *Unna P.*, Mon. f. prakt. Derm. 1885, XII; Derm. Studien, Heft 4; Zbl. f. Bakt. III; Mon. f. prakt. Derm. XIII u. 1895, XXI; Berl. kl. Woch. 1891; Mon. f. prakt. Derm. 1892, XIV; Derm. Woch. LXIX, 1919. — *Unna* u. *Pappenheim*, Mon. f. prakt. Derm. 1895, XXV. — *Verocay*, zit. nach *Herrheimer*. — *Walker*, Mon. f. prakt. Derm. XVI. — *Wehrli* u. *Knoll*, Beitr. z. Klinik d. Tub. 1909. — *Weigert C.*, Sitzungsber. d. schles. Ges. f. vaterländ. Kultur 1875 u. Fortschr. d. Med. 1887, V: Einführung in das Studium der Bakterien. Leipzig 1890. — *Weiß*, M. med. Woch. 1909, Nr. 9. — *Zenker*, M. med. Woch. 1894. — *Ziehl*, D. med. Woch. 1882. — *Zieler*, Zbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 1906, XVII.

Entkeimung.

(Sterilisation und Desinfektion mit Ausschluß der Filtration.)

Von Professor Dr. **Heinrich Reichel**, Wien.

Mit 12 Textabbildungen.

Einleitung.

Die Entkeimung, d. i. die Befreiung aller Art Gegenstände von entwicklungsfähigen Keimen irgendwelcher Mikroorganismen, gehört einerseits zu den wichtigsten Arbeitsmethoden des mikrobiologischen Laboratoriums, sie ist andererseits keineswegs auf dieses beschränkt, sondern sie bildet auch eine Hauptaufgabe vieler anderer Betriebe, deren wichtigste sind: die Sterilisation der Verbandstoffe und chirurgischen Instrumente, die Konservierung der Nahrungsmittel und die praktische Einschränkung und Tilgung der Seuchen. Dem mikrobiologischen Laboratorium fällt demgemäß zu: 1. Die praktische **Ausübung** der hier erforderlichen Arbeitsmethoden der Entkeimung; 2. die **Prüfung** oder Kontrolle der hier und anderswo geübten Entkeimungsmethoden und die Ausarbeitung neuer Methoden für die Praxis; 3. die wissenschaftliche, theoretische **Erforschung** der Entkeimungsvorgänge.

Eine Systematik der Entkeimungsmethoden, d. h. eine „Technik der Entkeimung“ könnte als Einteilungsgrund der Darstellung das angestrebte Ziel wählen, das verschieden weit gesteckt sein kann. Der Gegenstand würde dann umfassen: 1. Die **Sterilisation**, Abtötung aller Keime; 2. die **Desinfektion**, in strengem Wortsinne: Abtötung, in weiterem: Unschädlichmachung der krankheitserregenden Keime; 3. die **Antisepsis** oder Entwicklungshemmung und vielleicht noch 4. die **Asepsis** oder Keimfreihaltung. Aber auch die verschiedene Art der Methode könnte als Einteilungsgrund gewählt werden: die **mechanische**, die **thermische**, die **aktinische** und die **chemische**. In beiden Fällen wären jedoch die darzustellenden Entkeimungstechniken zum größten Teile selbst keine mikrobiologischen und die mikrobiologischen Techniken der **Prüfung** und **Erforschung** dieser Methodengruppen oder -arten fänden in beiden Fällen keinen guten Platz, denn sie müßten in jedem Kapitel wieder behandelt werden.

Es erscheint deshalb für eine knappe Darstellung der mikrobiologischen Methoden, die sich auf Entkeimung beziehen, nicht als zweckentsprechend von einer Systematik der Entkeimung auszugehen, vielmehr als Einteilungsgrund des Stoffes die obige Unterscheidung der Methoden in solche der Ausübung, der Prüfung und der Erforschung der Entkeimung zu wählen. Aus äußeren Gründen sind alle Methoden, die eine Entkeimung durch Filtration vorstellen, in dieser Abhandlung nicht berührt, sie erfahren eine gesonderte zusammenhängende Darstellung.

Systematische Darstellungen finden sich für Sterilisationsmethoden bei *Burri* (1906) und *Laubenheimer*² (1915), für Desinfektionsmethoden bei *Graßberger*¹ (1913), *Gottschlich* (1913) und *Croner*² (1913). Über die jeweils neuesten Fortschritte auf dem Gebiete der Desinfektion und Sterilisation, besonders über zahlreiche konstruktive Einzelheiten neuer Apparaturen unterrichten für die Jahre 1903—1908 die Sammelreferate von *Kausch*, doch bezieht sich davon nur wenig auf den oben angegebenen Inhalt der vorliegenden Schrift. Eine spezielle Darstellung der Sterilisationsmethoden des mikrobiologischen Laboratoriums gab zuerst 1885, zuletzt 1891 *Hueppe*³, wo auch die ältere Literatur des Gegenstandes berücksichtigt erscheint. Eine etwas ausführlichere neuere Darstellung (1915) ist das praktische Kapitel bei *Laubenheimer*² (S. 194 u. ff.), kürzere solche sind in allen Lehrbüchern der Bakteriologie enthalten. Über Prüfungsmethoden der Desinfektion und Sterilisation findet sich Zusammenfassendes in den Handbüchern bei *Gottschlich*, *Graßberger*¹, *Croner*² und *Laubenheimer*². Eine zusammenfassende Darstellung der Forschungsmethoden der Desinfektion und Sterilisation wird meines Wissens hier zum ersten Male versucht. Die theoretischen Forschungsergebnisse erscheinen bei *Bürgi* und bei *Graßberger*¹ (S. 83 u. ff., 1913) und zum Teil auch schon bei *Beneke* (1904) dargestellt.

I. Ausübung der Entkeimungsmethoden im Laboratorium.

Die Entkeimung wird im mikrobiologischen Laboratorium angewendet, um störende Wirkungen irgendwelcher Mikroben auszuschalten. Das Prinzip der Reinkultur erfordert vor allem die Fernhaltung fremder Keime, also die Keimfreiheit der Nährmedien und der mit diesen oder den Kulturen in Berührung kommenden Geräte, oft auch die Keimarmut der operierenden Hände. Auch für die Haltbarkeit der Nährmedien ist ihre Keimfreiheit hauptsächlich entscheidend. Endlich gehört es unbedingt zu den Aufgaben des mikrobiologischen Laboratoriums, dafür Sorge zu tragen, daß keinerlei der dort untersuchten Mikroben von dort aus wieder in die Außenwelt und zur Wirkung gelangen, soweit dies eben nicht in der Aufgabe des Laboratoriums liegt. Dazu ist die fortlaufende Abtötung oder sonstige Unwirksammachung der in und an den gebrauchten Nährmedien und Geräten befindlichen Keime erforderlich, die auch dann stattzufinden hat, wenn es sich um unschädliche, nichtkrankheitserregende Keime handelt. Diese letztere Forderung ergibt sich daraus, daß erstens die Unterscheidung schädlicher und unschädlicher Keime nicht immer einwandfrei möglich wäre, daß zweitens

solche Methoden erfahrungsgemäß nur dann zuverlässig ausgeübt werden, wenn sie für den Arbeitenden zur selbstverständlichen Gewohnheit geworden sind, und daß drittens in den Räumen eines mikrobiologischen Laboratoriums überhaupt die erreichbare Keimarmut aller Gegenstände angestrebt werden muß, um die zufällige Verunreinigung von Kulturen zu verhüten, wobei die wilde Anwesenheit gerade jener Keime, die dort kultiviert werden, naturgemäß besonders störend sein müßte.

1. Sterilisation im Laboratorium.

a) Sterilisation von Geräten.

Die große Mehrzahl der Methoden zur Sterilisation von Geräten hat thermischen Charakter. Am einfachsten gestaltet sich die Sterilisation jener Geräte, die eine beliebig starke Erhitzung in der Flamme, ein Ausglühen, vertragen. Für die unmittelbare und wiederholte Berührung der Kulturmasse werden deshalb solche Geräte: Nadeln, Ösen, Spatel u. s. w. bevorzugt. Sie müssen aus Edelmetall bestehen und werden, der größeren Haltbarkeit wegen, zumeist aus Platin hergestellt. Spitzen von Injektionshohlnadeln werden aus Platiniridium gefertigt, damit ihre Schärfe beim Glühen nicht abnimmt. Das Ausglühen der Platingeräte hat mit größter Sorgfalt unmittelbar vor der Berührung mit der Kulturmasse oder dem infizierten Gegenstände und sofort nach der Benützung zu geschehen.

Diese Regel kann dem Anfänger im mikrobiologischen Arbeiten nicht nachdrücklich genug eingeschärft werden. Ihre genaueste Einhaltung bildet geradezu das Kriterium des geübten Mikrobiologen. Es muß diesem unmöglich sein, eine — wenn auch kurz vorher ausgeglühte — Nadel ohne neues Ausglühen zu benutzen und ebenso — ja wegen der damit verbundenen großen Verantwortlichkeit noch viel mehr — die Nadel nach dem Gebrauch unausgeglüht aus der Hand zu legen, wenn auch nur für einen Augenblick. Auch hat der Vorgang des Ausglühens selbst in jedem Falle die gleiche Bewegung und Zeitdauer unter ständiger Kontrolle des Auges in Anspruch zu nehmen, damit nicht anhaftende Tröpfchen durch zu schroffes Erhitzen verspritzt werden oder Teile des Gerätes unausgeglüht bleiben. Der Mikrobiologe muß die sprichwörtliche Pedanterie des quantitativ arbeitenden Chemikers noch wesentlich übertreffen.

Von anderen Gegenständen können nur noch Asbest-, Quarz- und Lavageräte beliebig erhitzt werden. Asbestfilter werden häufig durch Ausglühen sterilisiert. Quarzgeräte sind im mikrobiologischen Laboratorium bisher kaum üblich, könnten aber geeignet erscheinen, die teuren Platingeräte, wenigstens zum Teil, zu ersetzen. Zu berücksichtigen wäre dabei allerdings die viel länger dauernde Auskühlung des Quarzes. Calcinierte Lavaplatten sind nach dem Vorbilde des Pariser

Pasteurinstitutes als bakteriologische Arbeitstische vielfach im Gebrauch. Ihre Haltbarkeit bewährt sich vorzüglich, auch bei schroffem Abglühen einer infizierten Stelle.

Schon wesentlich schwieriger ist die Sterilisation von Geräten durch *Abflammen*, die sowohl bei Metall- als auch Glasgeräten geübt wird. Es erfordert viel Geschicklichkeit, Übung und Geduld, um die Erhitzung weit genug und nicht allzuweit zu treiben. Eiseninstrumente dürfen nicht zu Stahl geglüht, noch weniger zu Oxyd verbrannt werden; im geschliffenen Zustande verlieren sie auch schon vor dem Anlaufen an Schärfe. Vernickelte, verzinnete, verzinkte, verkupferte Geräte können bei zu starker oder zu schroffer Erhitzung durch Abspringen der Außenschicht leiden. Glas- und Porzellangeräte endlich müssen langsam erhitzt werden, wenn sie nicht zerspringen sollen, und sie brauchen lange zum Auskühlen. Immerhin bleibt das Abflammen häufig die einfachste und schnellste, ja oft die einzig mögliche Methode der Sterilisation von Geräten. Das Verfahren wird gewöhnlich geübt bei der Vorbereitung von Entnahmeapparaten für bakteriologische Wasseruntersuchungen, bei der Sterilisation von Impf- und Blutentnahmelanzetten und von Injektionsnadeln. Ferner gehört hierher das Abflammen der Ränder von Glasgefäßen während der bakteriologischen Arbeiten, welcher Vorgang besonders dann gründlich und mit Vorsicht wegen des Zerspringens eingehalten werden muß, wenn Flüssigkeit über den Glasrand gegossen werden soll. Als Flamme dient die eines Bunsenbrenners oder eines Handgebläses für Benzin oder Spiritus.

Das Abflammen von Glas und Metall muß zum Zwecke der Sterilisation so weit getrieben werden, daß die Niederschlagung von Kondenswasser aus der Flamme an den Gegenständen gerade aufhört, und die Flamme den trockenen Gegenstand dann noch einige Augenblicke berührt. Am besten wird entweder die Flamme oder das Objekt lebhaft bewegt, wodurch die Erhitzung für größere Teile des letzteren gleichmäßig und damit minder gefahrvoll gestaltet werden kann.

Durch Abflammen werden auch oberflächlich bestäubte Wattebauschen vor dem Öffnen der damit keimdicht verschlossenen Gefäße sterilisiert, um zu verhüten, daß der durch die Berührung des Bauschens wieder in Bewegung gebrachte Staub infolge der beim Herausziehen entstandenen Luftverdünnung ins Innere des Gefäßes gesaugt wird. Soll ein Wattebausch öfter entfernt und wieder aufgesetzt werden, so empfiehlt es sich, ihn durch Benetzung mit Wasserglas feuerfest zu machen, wobei ihm, solange er noch feucht ist, eine dem Glasrand übergreifende Form gegeben werden kann (*Bartoschewitsch*). Eine besondere Art des Abflammens von Geräten ist das zuerst von *Ohlmacher* vorgeschlagene Eintauchen in brennbare Flüssigkeiten wie Benzin oder Spiritus, mit darauffolgendem Anzünden.

Für die meisten Metall- und Glasgegenstände und für viele Faserstoffe des mikrobiologischen Laboratoriums, die trocken aufbewahrt

werden können, geschieht die Sterilisation durch trockene Hitze ohne Berührung durch die Flamme als sog. Heißluftsterilisation. Voraussetzung für ihre Verwendung war die Erfahrung, daß keiner der auf unseren Nährböden kultivierbaren Mikroorganismen eine trockene Erhitzung auf 140° durch drei Stunden erträgt (*Koch und Wolffhügel*).

Als dieser Anwendungsweise gleichwertig wird gegenwärtig auch gebraucht: 150° durch zwei Stunden oder 160° durch eine Stunde. Sporenfreie Bakterien werden auch schon bei 100° in $\frac{1}{2}$ Stunde getötet.

Die schädigende Wirkung hoher Temperaturen auf lebende Substanz ist im Bereiche unter 160° noch nicht als Verbrennung, sondern in der Hauptsache als chemische Wasserwirkung, als eine hydrolytische Aufspaltung zu verstehen (*Rubner*³), die mit steigender Temperatur sowohl nach der bekannten Abhängigkeit aller chemischen Reaktionen von der Temperatur, als auch durch die zunehmende elektrolytische Dissoziation des Wassers beschleunigt wird.

Fehlt es aber der lebenden Substanz an Wasser, wie z. B. dem Sporeneiweiß, oder wird der Wassergehalt des Plasmas durch Trocknung während des Ansteigens der Temperatur vermindert, so verzögert sich damit naturgemäß der Destruktionsvorgang. Bei Temperaturen, die wesentlich unter 140° liegen, würde die trockene Sterilisation Zeiten erfordern, die in der Praxis des Laboratoriums nicht zur Verfügung stehen. Solange nur Glas- und Metallgeräte zu sterilisieren sind, besteht kein Bedenken gegen die Anwendung der hohen Temperaturen. Hingegen werden bei Trockensterilisationen, die auch Watte, Papier, Seide oder Leinwand betreffen, wegen der Röstung dieser organischen Materialien, deren phenolkörperhaltige Destillationsprodukte sich an den Glasflächen niederschlagen können, niedrigere Temperaturen bevorzugt.

Laubenheimer hält sogar eine Heißluftsterilisation von $\frac{1}{2}$ Stunde bei 130—140° für praktisch ausreichend. Tatsächlich mag sie ja oft genügen, weil die höchst resistenten Sporenarten häufig fehlen. Um sicher zu gehen, empfiehlt es sich am meisten, die Sterilisation solcher Glaswaren, die im Papier steril aufbewahrt werden sollen, zweimal hintereinander vorzunehmen: zuerst ohne Papier mit sicher zureichender Erhitzung, dann mit Papier in schonenderem Maße.

Diese Art von Sterilisation geschieht im Laboratorium zumeist in eigenen Trockensterilisiererschranken; das sind doppelwandige, ein- oder zweitürige, allseitig durch Asbestplatten gegen übermäßige Wärmeströmungen und -strahlungen geschützte Blechkästen; zur Not sind auch die gewöhnlichen Trockenschränke chemischer Laboratorien verwendbar. Die Erwärmung erfolgt meist direkt durch Gas-, Spiritus- oder Petroleumflammen, deren Verbrennungsgase den Mantelraum durchstreichen (Fig. 123). Seltener erfolgt die Erwärmung auch durch Elektrizität oder indirekt durch die Dämpfe hochsiedender Flüssigkeiten, z. B. Cumol (Isopropylbenzol, Siedepunkt 153°), die sich

im Mantelraum befinden und deren Kondensat durch einen Rückflußkühler zurückgeleitet wird. Besonders vollkommene Apparate sind dreiwandig und sichern eine gleichmäßige und rasche Erwärmung durch ständige Luftbewegung im Innenraume dadurch, daß der nach unten offene zweite Mantelraum oben in den Innenraum mündet, der dann in absteigender Richtung durchströmt wird (Fig. 124). Die austretende Heißluft wird den Heizflammen zugeführt (Regenerativheizung). Im Innenraum, dessen Dimensionen gewöhnlich $45 \times 28 \times 28$ betragen, aber je nach Bedarf kleiner und größer sein können, müssen Gitterroste angebracht sein, um ein direktes Aufstellen der Gegenstände auf den erhitzten Boden zu vermeiden; ferner befindet sich dort die Kugel eines außen ablesbaren Thermometers. Thermoregulation ist für solche Apparate,

Fig. 123.

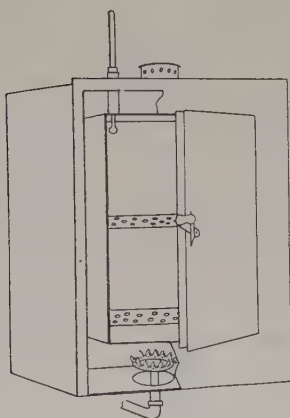
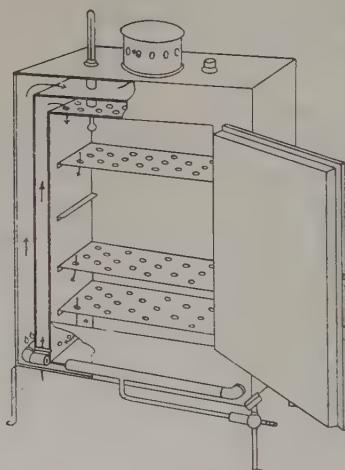


Fig. 124.



außer bei elektrischer Heizung im allgemeinen entbehrlich, da die gewünschte Temperatur leicht durch die Flammengröße einzustellen ist, doch kann durch die Anbringung von Quecksilberregulatoren immerhin an Aufsicht gespart werden.

Die einzelnen trocken zu sterilisierenden Gegenstände, oder, bei kleineren Objekten, wie: Pipetten, Spateln u. dgl. Gruppen solcher, müssen in reines Filtrierpapier verpackt in den Kasten gebracht werden, und sind bis unmittelbar vor dem Verbruche in der Verpackung zu belassen, damit Wiederverunreinigung durch Staub und Berührung verhütet werde. Geleimtes Papier ist als Hüllmittel ungeeignet, weil es leichter bricht und verkohlt als ungeleimtes. Bedrucktes, etwa Zeitungspapier ist wegen der zum Teil bei Hitze flüchtigen an den Objekten sich wieder niederschlagenden Bestandteile der Druckschwärze ungeeignet. Blechhülsen, am besten vernickelte, können für Einzelobjekte, z. B. Wasserentnahmeflaschen, die Papierhülle ersetzen

und werden bei Pipetten und Spateln noch außer dieser auch für mehrere Papierpakete verwendet. Ihr Gebrauch empfiehlt sich besonders für solche Geräte, die außerhalb des Laboratoriums in sterilem Zustande in Verwendung gezogen werden sollen.

Wichtig ist, daß die zu sterilisierenden Gegenstände in wirklich trockenem Zustande dem Verfahren unterworfen werden. Reste von Feuchtigkeit in den Objekten würden, abgesehen von der damit verbundenen Bruchgefahr, bewirken, daß diese noch durch eine unbekannt lange Zeit infolge der Verdunstungswärme eine niedrigere Temperatur als ihre Umgebung besitzen, so daß die Bedingungen des Verfahrens in unkontrollierbarer Weise verschoben wären. Es empfiehlt sich deshalb, die heiß zu sterilisierenden Gegenstände einer längeren gründlichen Vortrocknung, etwa bei offenem Apparat, zu unterziehen. Flaschen mit eingeriebenem Glasstoppel müssen durch Einlegen eines Fadens zwischen Glas und Stoppel davor geschützt werden, daß sie innen feucht bleiben und daß sich der Stoppel beim Abkühlen einklemmt.

Ein weiteres vielgeübtes thermisches Verfahren der Gerätesterilisation ist das Auskochen in Flüssigkeiten. Dabei kommen andere als wässrige Flüssigkeiten nur selten zur Verwendung. Man hat für die Sterilisation von Instrumenten auch das Auskochen in Öl in Vorschlag gebracht (*Conradi*², *Amako*), weil die dabei erreichten Temperaturen ausreichen, um die wasserfreien Objekte binnen kurzem vollständig zu sterilisieren. Die Schwierigkeit, das anhaftende Öl von den Gegenständen wieder zu entfernen, hat aber das Verfahren nicht zu einem allgemein-geübten werden lassen.

Man begnügt sich vielfach mit dem Auskochen von Geräten in Wasser oder wässrigen Lösungen, obwohl die so erreichbaren Temperaturen nicht alle überhaupt vorkommenden Arten von Mikroorganismen in praktisch verwendbaren Zeiten abtöten. Für viele Zwecke jedoch, z. B. für Operationen, genügt eine solche partielle Sterilität der Geräte deshalb, weil die gegen Hitze höchst resistenten Mikroorganismen nicht zu den pathogenen gehören. Soll durch einfaches Auskochen von Geräten die Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit überlebender Keime nach Möglichkeit herabgesetzt werden, so wird das Kochen eben so lange als möglich fortzusetzen sein. Im allgemeinen wird aber ein mehr als einstündiges Auskochen den Erfolg nur mehr wenig zu steigern vermögen. Die Dauer des Kochens wird in der Praxis auch von der Kochwiderstandsfähigkeit des Materiales abhängen, das gekocht werden soll. Die meisten Metalle leiden durch allzulanges Kochen. Von Gummisorten können überhaupt nicht alle ohne Schaden bis zur Siedetemperatur erhitzt werden, worauf schon beim Einkaufe zu achten ist. Viele Materialien, besonders Filtersteine, würden durch schroffes Erhitzen leiden, weshalb sie schon mit dem kalten Wasser zusetzen sind. Für alle bakteriologischen Zwecke sind nur solche Glas-sorten brauchbar, die, mit wässrigen Flüssigkeiten erhitzt, an diese kein

Alkali abgeben (*Ficker*¹). Frisch gekaufte Gläser geben auch bei den besten Sorten anfangs kleine Mengen Alkali ab und müssen deshalb vor der Verwendung durch längere Zeit gedämpft oder gekocht werden. Die Verwendung natürlichen kalkhaltigen Wassers zum Auskochen beschädigt alle Objekte durch Niederschlagung des kohlensauren Kalkes auf deren Oberfläche, weshalb nach Tunlichkeit destilliertes, oder doch bereits abgekochtes Wasser zu verwenden ist. Die Wirksamkeit des Kochens kann sehr erhöht oder abgekürzt werden durch Zusatz von Salzen, wie CaCl_2 , die je nach ihrer Konzentration die Siedetemperatur bis 115° erhöhen können. Auch durch Zusatz von 1—2 % Soda wird nach *Schimmelbuschs* Vorgang die Kochwirkung gegenüber den Mikroorganismen erhöht, zugleich die arrodierende Wirkung gegenüber den Metallen vermindert und die Niederschlagung von Kalk verhütet. Besondere Auskochapparate, flache Wannen mit Einsatzrost und Deckel werden gewöhnlich zum Auskochen von Operationsinstrumenten verwendet.

Auch das Dämpfen kann zur Entkeimung von Geräten mit gleicher Wirksamkeit wie das Kochen in Betracht kommen. Die einschlägigen Apparate sollen erst bei der Sterilisation der Flüssigkeiten erörtert werden. Für die besonders schwer sterilisierbaren Korke wurde durch *Bordas* die abwechselnde Einwirkung des Vakuums und gespannter Dämpfe empfohlen, das, wie *Rubner*⁵ zeigte, das Eindringen der Dämpfe in poröse Objekte überhaupt beschleunigt.

Auch andere Verfahren als thermische wurden gelegentlich zur Sterilisation der Geräte des Mikrobiologen angewendet, doch handelt es sich dabei fast immer auch nur um eine partielle Sterilisation, d. h. um die sichere Ausschließung bestimmter Keimarten, wie z. B. der pathogenen. Sog. chemische (richtiger Lösungs-) Desinfektionsmittel: Benzin, Alkohol (70 % ig, s. *Beyer*), Carbol- und Kresollösungen, werden zur Sterilisation von Nadeln und Lanzetten bei der Impfung und Blutentnahme, die letztgenannten auch zur Entkeimung von nicht erhitzbaren Gummi- und anderen Geräten verwendet. Die Wände des Laboratoriums können durch sog. desinfizierende Anstriche (*Jakobitz, Rapp, Hüne*²), die Fußböden durch Linoleumbelag und die Türklinken durch Herstellung aus kupferhältigen Legierungen (*Bitter*²) keimarm gehalten werden, doch sollen solche Wirkungen nicht überschätzt werden (*Saltikow, Wagener*). Auch werden bei der Prüfung eines Grundwassers auf Keimgehalt die geranneten oder gebohrten Rohre und die Umgebung ihrer Sauglöcher zunächst durch Eingießen von 2 % iger Kresolseifenlösung, die nach Schließen des Kugelventils das Rohr durch sechs Stunden füllen muß, in praktisch ausreichendem Maße sterilisiert. Auch echt chemische Wirkungen kommen vor: bei der Gewinnung der *Much-Römerschen* Perhydrasemilch wird das Melkgefäß durch vorheriges Einbringen der später zur Sterilhaltung der Milch erforderlichen Menge einer 30 % igen H_2O_2 -Lösung praktisch sterilisiert. Auch *Eichholz* empfiehlt H_2O_2 -Lösungen zur Sterilisation von Metallinstrumenten.

Endlich kommen auch die operierenden Hände des Mikrobiologen unter Umständen als „Geräte“ in Betracht, deren „Sterilität“ erwünscht sein kann. Die gleiche Frage spielt ja für den Chirurgen bekanntlich eine weit größere Rolle und auch für den Mikrobiologen taucht sie hauptsächlich bei der Operation von Versuchstieren auf. Es kann deshalb auf die ausführlichen Darstellungen der sog. chirurgischen Händedesinfektion, richtiger: Händesterilisation verwiesen werden (s. *Graßberger*¹, S. 238, *Gottschlich*, S. 532, s. auch *Küster, Neufeld*). Natürlich handelt es sich hier immer nur um partielle Sterilität. Es gelingt aber hier nicht, ganze Arten von Keimen, etwa die pathogenen, auszuschalten, sondern nur solche Gruppen von Keimen aller Art, die sich infolge ihrer zufälligen Lage entfernen oder festhalten lassen. Es sind also vielmehr Reinigungs- und Fixierungs- als Tötungsmethoden, die hier Anwendung finden: das Waschen, besonders mit Hilfe chemischer (Seife u. s. w.) und mechanischer (Bürste, Ton u. s. w.) Unterstützungsmittel oder das Überziehen der trockenen Haut mit Fixierungsmitteln wie: absoluter Alkohol, Benzin- und Mastixlösungen. Methoden, die aber immerhin zweckmäßigerweise eine Ergänzung durch Desinfektionsverfahren, wie: Bad in 1‰igem Sublimat, 2%iger Kresolseifenlösung, 70%igem Alkohol u. a. erfahren können, um die Wahrscheinlichkeit des Zurückbleibens gerade pathogener Keime noch zu vermindern.

b) Sterilisation von Flüssigkeiten.

Auch für die Sterilisation von Flüssigkeiten kommen — wenn von Filtrationsmethoden hier abgesehen wird — die thermischen Entkeimungsmethoden fast ausschließlich in Betracht. Das einfache Kochen oder Dämpfen der fast immer wässrigen Medien genügt im allgemeinen nicht, weil die zu fordernde Sterilität zumeist eine vollkommene sein muß, und die Erwärmung auf 100° oder auch etwas mehr zur Abtötung häufig vorkommender Sporenbakterien in kurzen Zeiten nicht ausreicht. Öl, Vaseline u. dgl. wird meist durch zweistündiges Erwärmen auf 120° „sterilisiert“. *Bullock* hat gezeigt, daß zur ganz zuverlässigen Sterilisierung obiger Flüssigkeiten stärkere Erhitzungen erforderlich sind, die sogar noch über die bei Trockensterilisierung als verläßlich angenommenen Grenzen hinausgehen (170°, 30 Minuten). Glycerin wird jedoch schon bei 130° in ganz kurzer Zeit steril.

Destilliertes Wasser kann nur unter besonderen Kautelen keimfrei gewonnen und aufbewahrt werden. Für manche Zwecke, z. B. die Auflösung von Salvarsan, muß aber eine solche primäre Keimfreiheit verlangt werden, weil auch die Leiber der abgetöteten Keime störend wirken.

Die Forderung der völligen Keimfreiheit trifft insbesondere die für die Kultur der Mikroorganismen bestimmten Nährböden, d. h. echte und kolloidale Lösungen, Suspensionen und Emulsionen organischer Stoffe, deren Haltbarkeit durch jede Art anwesender Keime bedroht ist,

wenn schon deren Anwesenheit das Kulturverfahren selbst vielleicht nicht immer wesentlich stören würde. Gerade diese Entwicklungsfähigkeit der das Kochen überdauernden Sporenkeime in solchen flüssigen oder gelatinierenden Nährsubstanzen gestattet aber unschwer die völlige Entkeimung. Setzt man das gekochte Substrat unter Temperaturbedingungen, die für die Entwicklung jener Sporen so günstig als tunlich sind, so kann man im allgemeinen nach 12—24 Stunden darauf rechnen, die weitaus meisten anwesenden Keime in frisch ausgekeimtem, sporenfreiem Zustande anzutreffen, also durch ein zweites Kochen leicht töten zu können. Das gleiche Verfahren ein zweitesmal angewendet, ergibt nach dem dritten Kochen spätestens am dritten Tage ein erfahrungsgemäß fast immer keimfreies Substrat. Der ganze Vorgang heißt diskontinuierliche, auch fraktionierte Sterilisation und wurde zuerst, allerdings für Temperaturen unter 100°, von *Tyndall* (S. 210, 337) angegeben. In manchen Fällen mag eine dritte oder gar vierte Wiederholung dieses Vorganges erforderlich sein. In der Praxis genügt jedoch die zweimalige Wiederholung. An Mißerfolgen ist zumeist schuld, daß zwischen den drei Kochprozessen keine günstigen Auskeimungstemperaturen angewendet werden. Jede einzelne Erhitzung der diskontinuierlichen Sterilisation soll nicht länger als 15 Minuten anhalten, da längere Zeiten zur erstrebten Abtötung vegetativer Formen unnötig und für das chemische Gefüge des Nährbodens doch oft nicht gleichgültig sind. Aus letzterem Grunde wird manchmal (*Heim*, S. 95) eine einmalige länger dauernde Erhitzung (40 Minuten) der dreimaligen kurzen vorgezogen, doch dürften die Resultate dieses Verfahrens wohl nur dann gleichwertige sein, wenn schon bei der Bereitung der Nährböden das Hineingelangen hartnäckiger Sporenkeime, die sich besonders in Erde und Staub, mancherorts aber auch im Wasser und fast überall in der Milch finden, vermieden werden kann.

Die Sterilisation reiner Chemikalienlösungen gelingt allerdings fast immer, wenn nur steriles Wasser verwendet und auf Staubfreiheit geachtet wird, schon durch einmaliges Kochen. Manche Stoffe, die eine Erhitzung in Wasser nicht ohne chemische Zersetzung ertragen, können in trockenem Zustande ohne Schaden erhitzt werden. So sind nach *Hueppe*³ (S. 218) und *Leube* Harnstoffkrystalle durch halbstündiges Erhitzen auf 106° ausreichend zu sterilisieren.

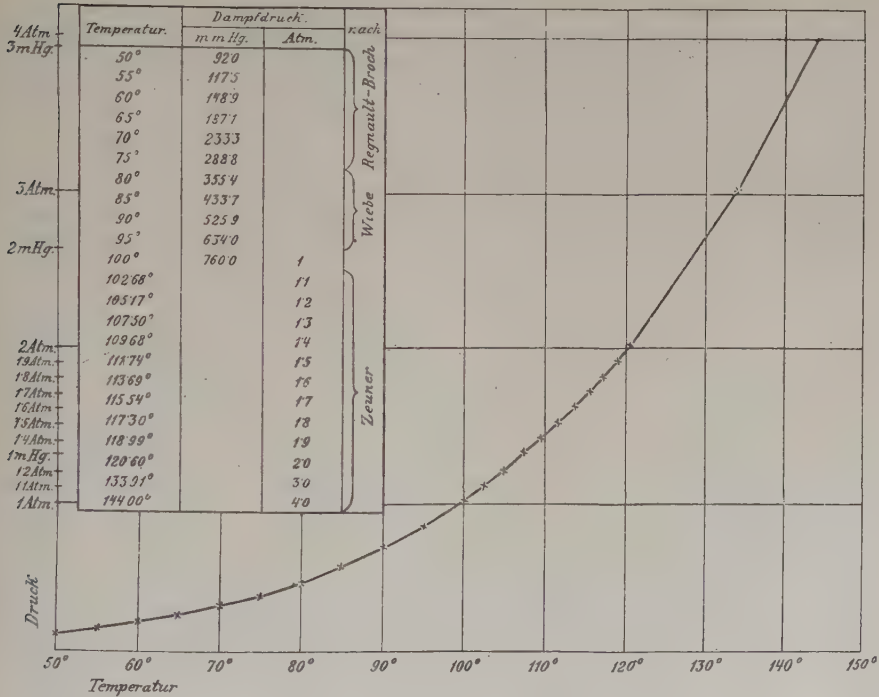
Soll die Sterilisation von Flüssigkeiten durch Erhitzung zuverlässig in einem Zuge durchgeführt werden, so muß die Einwirkung höheren Dampfdruckes und damit auch höherer Temperatur Platz greifen. Die beiden Größen hängen nach der zuerst von *Regnault* ermittelten, in Fig. 125 dargestellten Beziehung eindeutig voneinander ab.

Diese feuchte Hitze verlangt weit geringere Einwirkungszeiten als die trockene (*Koch*, *Gaffky* und *Löffler*, *Koch* und *Wolffhügel*). Auch die widerstandsfähigsten bekannten Sporen (*Globig*, *Christen*) gehen bei 1.5 Atm. Dampfdruck, d. h. bei nahezu 112°, in 1½ Stunden, bei 3 Atm..

d. h. etwa 134° , sofort zugrunde. *Burri* empfiehlt für die Praxis 1·5 Atm. durch 20 Minuten, was jedoch nur bei Abwesenheit hochresistenter Sporen genügen kann. Am häufigsten wird ein Druck von 3 Atm. für ganz kurze Zeit, etwa 10 Minuten als Erwärmungsdauer der Objekte, angewendet.

Ein solches Verfahren ist naturgemäß nur möglich, wo durch so hohe Temperaturen keine chemischen Zersetzungen zustande kommen, z. B. bei organischen Stoffen nur in streng neutralen Lösungen und nicht

Fig. 125.



bei Gegenwart von Zuckern, die dabei zumeist teilweise in Säuren übergehen. Erforderliche Zusätze an überschüssigem Alkali und an Zucker sind bei solchem Sterilisationsverfahren immer erst nachträglich als sterile konzentrierte Lösungen zuzufügen. Besonders geeignet ist das Drucksterilisationsverfahren für die rasche zuverlässige Sterilisation von Wasser oder reinen Chemikalienlösungen, die frei von organischen Stoffen sind. In solchen Flüssigkeiten kommen durch die hohe Temperatur bedingte Umsetzungen kaum vor und gerade sie sind durch die diskontinuierliche Sterilisation nicht von etwa vorhandenen Sporen zu befreien, weil diese ja kein zur Auskeimung geeignetes Medium in ihnen finden. Wird anderseits ein zu sterilisierendes Substrat schon durch Temperaturen von rund 100° in seinem Gefüge ernstlich gestört,

wie z. B. Blutserum, Impfstoffe und andere Lösungen oder Suspensionen genuiner Eiweißkörper, auch Gelatinenährböden, die durch Erhitzen allmählich an Erstarrungsfähigkeit verlieren, so bleibt nur die Methode der diskontinuierlichen Erwärmung nach *Tyndall* (S. 179) auf eben noch erträgliche Temperaturen. Eine sichere Abtötung der vegetativen Bakterienformen darf bei 65° in 15 Minuten erwartet werden (*Forster*^{1, 2}). Zur Erreichung voller Sterilität wird beim *Tyndall*-Verfahren mit Temperaturen unter 100° wegen der minder einschneidenden Wirkung im allgemeinen eine öftere Wiederholung mit zwischengeschalteter Haltung bei Bruttemperatur erforderlich sein als beim Kochen.

Eine unbedingte Sicherheit kann dem *Tyndall*-Verfahren seiner Natur nach überhaupt nicht zukommen (*Miquel*), was jedoch seinen Wert für die Praxis kaum beeinträchtigt, zumal ja auch die anderen Tötungsverfahren, wenn sie auch theoretisch voll zuverlässig erscheinen, in der Ausführung doch wieder Fehlerquellen aufweisen. Die von *Miquel* und *Lattraye* an Stelle des *Tyndall*-Verfahrens empfohlene einmalige Erhitzung auf 110° durch 15 Minuten kann auch nur bei Abwesenheit hochresistenter Sporen genügen. Die günstigsten Temperatur- und Zeitbedingungen des *Tyndall*-Verfahrens bedürfen für jeden besonderen Fall auch besonderen Studiums, das heute noch größtenteils aussteht. Ansätze genauerer Prüfung liegen vor für Mesentericussporen bei *Wroblewski*, für Milzbrandsporen bei *Weil*.

Das einmalige Erwärmen auf Temperaturen unter 100° mit nachfolgender Entwicklungshemmung durch rasches Abkühlen und dauernde Kühllhaltung heißt *Pasteurisieren* (*Pasteur*^{1, 2}, *Forster*^{1, 2}). Hierbei wird die Zahl der vegetativen Formen je nach der verwendeten Temperatur und Zeitdauer mehr oder weniger zurückgedrängt, das Auskeimen der Sporen im Gegensatz zum *Tyndall*-Verfahren absichtlich verhütet. Das Pasteurisieren findet Anwendung zur partiellen Sterilisation und zur Desinfektion, z. B. bei Milch und bei Konservierung hitzeempfindlicher Flüssigkeiten aller Art.

Bei der Abtötung von Keimsuspensionen bei mäßigen Temperaturen muß auch auf die von *Ficker*¹ festgestellten Abhängigkeiten der Absterbedauer von dem Gefüge der suspendierenden Lösung und der Dichte der Suspension geachtet werden.

Apparate. Das Erhitzen von Flüssigkeiten auf Siedetemperatur geschieht zumeist in Rund- oder Erlenmeyerkolben, in denen die Flüssigkeit unter Watteverschluß verwahrt ist, gewöhnlich nicht durch die direkte Flamme, sondern indirekt in Töpfen, die als Wasserbäder oder mit Rosteinsatz zu benutzen sind. Der von *Koch*, *Gaffky* und *Löffler* angegebene, gewöhnlich nach ersterem benannte Dampftopf (Fig. 126) unterscheidet sich von solchen Improvisationen nur durch den Wärmeschutzbelag, den Wasserstandszeiger, Ablaßhahn und das Thermometer im Deckel. Ein besonderes Abdampfrohr fehlt hier noch; zwei Haken dienen zum Anbinden von Gegenständen. In solchen Apparaten muß der aufsteigende Dampfstrom ein sehr lebhafter sein, wenn die Siedetemperatur im ganzen Raume herrschen soll. Andernfalls gelingt

es nämlich nicht, den Raum luftfrei zu machen oder zu erhalten, womit bei Atmosphärendruck die Temperatur niedriger als 100° sein muß, so daß der Sättigungszustand der Dampfphase nicht zu erreichen ist (*Gruber*^{1, 2}). Es liegt also hier eine gewisse Dampf- oder Wärmever-schwendung vor.

Man hat später versucht, solche Apparate dadurch wärmeökonomischer zu gestalten, daß man die Flammenabgase in einem Mantelraume um den Körper des Topfes aufsteigen ließ (Fig. 127). Solche Konstruktion hat zwar durch Erhitzen der Wände zur Folge, daß das Dampfluftgemisch im Innenraum nun 100 und sogar mehr Grade annimmt, womit jedoch der die Dampfsättigung ausschließende Luftgehalt nicht abnimmt und die Differenz zwischen maximaler und tatsächlicher Dampfspannung durch die Überhitzung noch zunimmt. Für die Sterilisation von Flüssigkeiten ist das allerdings belanglos, doch muß diese Apparatkonstruktion deshalb als fehlerhaft gelten, weil ihr Dampf gegenüber festen Objekten, wie Metall und Glasgeräten und besonders Faserstoffen, Tüchern, Arbeitsmänteln,

Fig. 126.

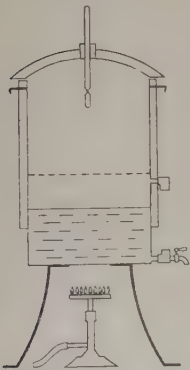


Fig. 127.

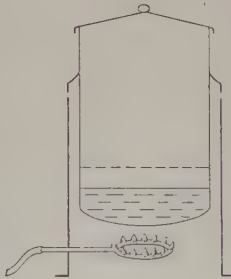
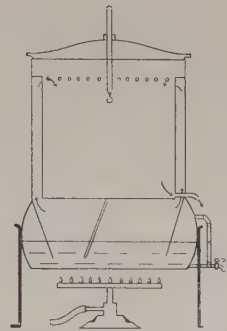


Fig. 128.



Watte, die etwa im Apparat desinfiziert werden sollen, ein vermindertes Desinfektionsvermögen im Vergleich zu gesättigtem Dampf aufweist (*v. Esmarch*¹, *Rubner*³, *Graßberger*¹ [S. 156]).

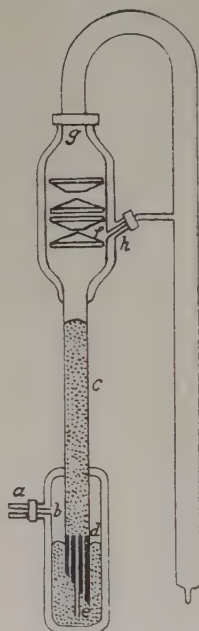
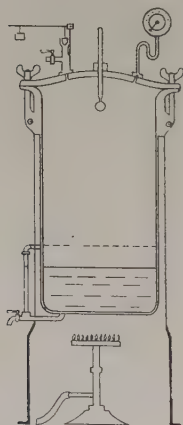
Die beste Konstruktion von Laboratoriumsdampftöpfen, wie sie zuerst von *Merke* angegeben wurde, leitet den Dampf durch einen Mantelraum in den oberen Teil des Topfes und im Innenraum sinkend zum Abdampfrohr (Fig. 128). Hier kann mit viel geringeren Dampfmen-gen die volle Siedetemperatur und Dampfsättigung des leicht von Luft befreiten Raumes sichergestellt werden und es liegt keine Gefahr der Überhitzung des Dampfes vor. Zur Apparatur des Dampftopfes gehören auch Einsatzdrahtkörbe für kleinere Objekte, wie Eprouvetten u. a.

Dampfdrucktöpfe oder Autoklaven sind meist nach dem bekannten Prinzip des *Papinschen* Topfes mit Laufgewichtventil konstruiert (Fig. 129). An die Stelle dieses Ventils können auch automatische Dampfdruckregler, wie der *Lautenschlägers* (Fig. 130) treten. Durch das Rohr *a* kommuniziert die Ventilkammer *b* mit dem Innenraum des Apparates. In das die Kammer halb erfüllende Quecksilber taucht das Steigrohr *c*, das durch einen unten abgeschrägten Stoppel *d* verschlossen

ist, der einen Kranz feiner Bohrungen um ein weiteres, tiefer eintauchendes, zentrales Sicherheitsrohr *e* besitzt. Bei Verdrängung des Quecksilbers durch den Dampf werden allmählich immer mehrere von den feinen Bohrungen für den Dampf passierbar, schließlich im äußersten Falle auch das weite Rohr. Die oberen Konstruktionsteile dienen der Auffangung hinaufgeworfenen Quecksilbers (*f*), dem Entweichen

Fig. 130.

Fig. 129.



des Dampfes (*g*) und dem Ablauf des Kondenswassers (*h*). Durch verschiedene Stellung des Rohres *c* zur Kammer *b* wird der gewünschte Druck erreicht.

Arba gibt einen Apparat an, der sowohl mit Atmosphärendruck als auch unter Spannung bis 0.5 Atm. Überdruck, *Vogel* einen solchen, der zu Dampfdrucksterilisation und zum Auskochen von Instrumenten verwendet werden kann.

Auch bei den Dampfdruckapparaten muß auf Luftfreiheit geachtet werden, die durch Offenlassen des Ventils bis zum starken Strömen des Dampfes hier leicht zu erreichen ist. Ein Luftgehalt würde zwar die Dampfsättigung nicht stören, aber eine Druckerhöhung um den unbekannten Partiärdruck der Luft bewirken, so daß die Innentemperatur mit dem Druck nicht übereinstimmen würde und somit auch nicht zu erkennen wäre, wenn sie nur mit dem Manometer gemessen wird.

Für die Durchführung des *Tyndallschen* Verfahrens und der Pasteurisierung kommen als Apparate einfache Wasserbäder, besser solche mit Mischvorrichtungen und Temperaturregelung (*Ostwald*¹⁾ in

Betracht, in denen der zu erwärmende Kolbeninhalt nach Möglichkeit unter die Oberfläche zu versenken ist. *Koch*² hat einen allseits von Wassermänteln umgebenen Thermostaten für solche Zwecke konstruiert, der von *Wisnegg* verbessert wurde (s. *Hueppe*³, S. 183), *Roth* hat einen Apparat angegeben, der durch ungespannte Dämpfe von konstant siedenden Chloroform-Benzin-Gemischen auf Temperaturen um 60° zu erhalten ist. Besonders geeignet sind auch Einrichtungen, die ein Sieden des Wassers bei erniedrigtem Druck gestatten (*Rubner*⁵, *Schut*, *Grimm*).

Andere als thermische Verfahren zur Sterilisation von Flüssigkeiten und Nährböden kommen im mikrobiologischen Laboratorium, von Filtrationsverfahren immer abgesehen, nur wenige zur Anwendung. Bei chemischen Verfahren ist sehr auf Einhaltung wirksamer Zeit-Konzentrations-Kombinationen zu achten, da so „sterilisierte“ Keimsuspensionen erfahrungsgemäß häufig zu Laboratoriumsinfektionen Anlaß geben. Suspensionen von Bakterien, die als Impfstoff oder zu Agglutinationszwecken dienen sollen, werden, soweit dies nicht schon durch Hitzeeinwirkung geschehen ist, durch die längerdauernde Einwirkung von Carbol oder Kresol. *Laubenheimer*¹ empfiehlt 1%iges Cl-m-Kresol, „Phobrol“, sterilisiert. Solche Suspensionen werden dann durch Verdünnung auf 0.5% Carbolgehalt gebracht oder auch sogleich durch einen solchen Dauerzusatz oder auch durch überschüssiges Chloroform, durch Aceton, Toluol, Thymol zur Verhütung des Anwachsens etwa hineingelangter fremder Keime konserviert. Auch zur Konservierung von Serum dient oft ein gleicher Zusatz. Pockenlymphe wird durch den Zusatz von Glycerin nach längerer Zeit von lebenden verunreinigenden Keimen befreit. Durch Temperaturerhöhung auf 37° kann dieser Erfolg sehr beschleunigt werden (*Levy* u. *Krenker*). In manchen Fällen dienen chemische Mittel zur sonst schwierigen Keimfreimachung von Nährböden, z. B. Sublimat zur Sterilisation der Oberfläche von Kartoffeln, Eiern u. a.

Die Keimfreihaltung von steril ermolkener Milch kann durch Zusatz von 1‰ H_2O_2 erreicht werden, der nach beliebiger Zeit durch Zufügung von steriler Katalase wieder voll beseitigt werden kann (*Much* u. *Römer*), so daß solche sterile Frischmilch auch noch als Nährboden Verwendung finden kann. Auch Wasser kann durch ganz analoges Verfahren ohne Kochen in sterilen Zustand gebracht (*Reichel*¹) und so in seinem ungestörten Gefüge für bestimmte Versuche verwendet werden. Die Sterilisation natürlichen Wassers ganz ohne Änderung seiner Zusammensetzung gelingt noch vollständiger durch die Quarzlampe (Lit. s. S. 24), die auch für die Sterilisation von Impfstoff empfohlen wurde (*Friedberger* u. *Mironescu*, *Friedberger* und *Jamamoto*).

Die Methoden der keimfreien Entnahme von Flüssigkeiten und anderen Materialien, sei es zur Gewinnung von Nährsubstraten,

wie: Blut, Milch, Fleisch u. a., sei es zum Zweck der Untersuchung der entnommenen Stoffe, wie: Blut, Organteile, Wasser, können hier nicht ausführlich behandelt werden.

Die keimfreie Verwahrung steriler Objekte geschieht vor allem durch Schutz vor Berührung und Staub, bei festen Gegenständen zumeist durch Glasglocken und Papier. bei Flüssigkeiten besonders durch den Watteverschluß der Gefäße, der zu dem Filtrationsverfahren der Sterilisation zu zählen ist. Aber auch hier kommen glockenförmige Verschlußvorrichtungen und Papierverschluß auch in Verbindung mit Watte zur Anwendung (s. *Hueppe*³, S. 204). Dichte Verschlußpfropfen entstehen durch Paraffinierung der Wattebauschen; auch Kork sind zu paraffinieren, um ein dichtes Anschließen an das Glas zu bewirken. Zum Verschluß von Gefäßen, in denen Überdruck droht, eignen sich besonders die von *Pannwitz* empfohlenen gelochten Gummikappen.

2. Desinfektion im Laboratorium.

Das Vorgehen zur Verhütung der Verstreung von Keimen beim mikrobiologischen Arbeiten deckt sich zum Teil mit jenem zur Keimfreimachung von Geräten und Nährböden. Doch erscheint eine zusammenhängende Darstellung dieser Methoden, wobei besonders das Abweichen von den eben geschilderten Verfahren zu betonen sein wird, durch die Wichtigkeit ihrer gemeinsamen Aufgabe gerechtfertigt.

Durch das Ausglühen benutzter Platingeräte sollen die anhaftenden Keime vernichtet und unschädlich gemacht werden. Das Wegspritzen von Tropfen oder Nährbodenteilchen muß deshalb sorgfältig, u. zw. durch Vortrocknung der Geräte über der Flamme, vermieden werden. Auch andere Objekte, wie Tische, Metall- und Glasgeräte, die etwa versehentlich infiziert wurden und durch sofortiges Abflammen zu desinfizieren sind, müssen, bevor die Flamme in unmittelbare Berührung mit ihnen tritt, durch warme Luft vorsichtig getrocknet werden, wenn ein Verspritzen der noch infektiösen Flüssigkeitströpfchen und in manchen Fällen auch ein Zerspringen der Geräte verhütet werden soll.

Das Auskochen aller gebrauchten Geräte und Nährböden bildet die gebräuchlichste und billigste Desinfektionsmaßnahme im Laboratorium. Die Siedetemperatur tötet alle pathogenen Keime in 15 Minuten, die vegetativen Formen schon in wenigen Augenblicken. Für die Praxis empfiehlt sich trotzdem ein einstündiges Kochen. Schon die in der Tiefe von festeren Nährbodenteilchen befindlichen oder anfangs an die Wände des Gefäßes verspritzten Tröpfchen verlangen eine längere Dauer der Erhitzung als die theoretisch zureichende. Es handelt sich aber auch vielfach um die Vernichtung sehr widerstandsfähiger Saprophyten, deren Verstreung, wenn sie auch nicht für Erregung von Krankheiten gefährlich wäre, gerade im Laboratorium vermieden

werden soll. Das Auskochverfahren stößt häufig auf die Schwierigkeit, daß das Kochwasser durch Verunreinigung, besonders durch Auflösung organischer Nährbodenbestandteile leicht die Eigenschaft annimmt zu schäumen, so daß beim Überkochen auch noch ungenügend erhitztes, also undesinfiziertes Material aus dem Kochgefäß wieder herausgelangen kann. Zur Verhütung dieses Vorkommnisses darf das Kochgefäß nicht höher als bis zur Hälfte gefüllt werden, es muß die Häufung stark schaumgebender Stoffe vermieden und die Feuerung sorgfältig überwacht werden. Ein geeigneter Apparat, von *Kroenig* und *Paul*³ angegeben, wird bei *Lautenschläger* erzeugt. In letzter Zeit zeigte *Dold*, daß die Dämpfe bakterienhaltiger kochender Flüssigkeiten anfangs noch lebende Keime, besonders Sporen in Tröpfchen mit sich reißen können.

In gleicher Weise wie das Auskochen kann auch das D ä m p f e n zur Desinfektion herangezogen werden für feste Gegenstände, wie Glas-, Metallgeräte, Arbeitsmäntel, Tücher u. dgl., jedoch nur dann, wenn die Konstruktion des Dampfapparates die Dampfsättigung sicherstellt. Beim Dämpfen gebrauchter fester Nährbodenmassen ist darauf zu achten, daß diese in der Wärme flüssig werden. Die Glasgefäße, die sie enthalten, müssen in den Dampftopf entweder in einer Stellung eingebracht werden, die das Ausfließen verhindert, oder in einem größeren, dichten Gefäße.

Auch chemische Desinfektionsmittel werden im Laboratorium regelmäßig zur Verhütung der Verstreuerung von Keimen angewendet. Am Arbeitstisch des Mikrobiologen befindet sich ständig ein Glas, eine Wanne oder Schale mit einer Lösung von 1‰igem Sublimat, 3% Carbol, 2%iger Kresolseife, 1% Formaldehyd oder 70%igem Alkohol, um Deckgläschen, Objektträger, Blutentnahmeflässe, Agglutinationsröhrchen, auch Pipetten und Eproutetten sofort nach dem Gebrauche aufzunehmen und einer Desinfektion zuzuführen. Eine gewisse Gefahr, daß die beabsichtigte Wirkung ausbleibt, liegt hier schon darin, daß das Desinfizien oft nicht alle infizierten Stellen erreicht, z. B. die Agglutinationströpfchen in den mit Vaseline abgedichteten Kammern der Hohlsliffobjektträger, die Keime in verstopelten Eproutetten oder Agglutinationsröhrchen, oder die Keime an der Innenwand des herausstehenden Teiles von Pipetten. Der geübte Mikrobiologe läßt deshalb Eproutette und Stoppel sowie Deckglas und Objektträger getrennt in die Flüssigkeit sinken und saugt nötigenfalls diese in den Pipetten höher auf als vorher die keimhaltigen Flüssigkeiten. Auch sonst kann aber das Verfahren Anlaß zu Laboratoriumsinfektionen geben, so wenn die Zeitdauer der Einwirkung nicht lange genug ist, oder wenn das gewählte Desinfizien gegenüber den zu desinfizierenden Keimen überhaupt unwirksam ist, wie z. B. Carbol und Kresole gegen Milzbrandsporen. Es empfiehlt sich aus diesen Gründen im allgemeinen diese Desinfektion am Arbeitstisch als eine bloß vor-

läufige zu betrachten und dann das Glasgefäß samt Inhalt noch einer Dampfdesinfektion auszusetzen. Dabei muß darauf geachtet werden, daß nicht Sublimatlösungen in Berührung mit ebenfalls auszukochenden Metallgegenständen geraten.

Wenn eine infektiöse Flüssigkeit auf irgend eine Weise versehentlich auf Tische, Kleider oder Fußboden gelangt, so sind diese Objekte raschestens im weitesten Umkreis möglicher Verstreuerung der Keime mit einer der oben genannten Desinfektionslösungen ausgiebig zu benetzen und durch entsprechend lange Zeit unter dieser Einwirkung zu belassen. Tropft infektiöse Flüssigkeit von Tischhöhe auf den Fußboden, so haben die Bodenfläche im Umkreis von 2 m und alle etwa in diesem Bereich befindlichen Gegenstände, natürlich auch Schuhe und Kleider von Personen in dem bodennahen Teile als wahrscheinlich infiziert zu gelten.

Auch sonst können Möbel und Geräte in vielen Fällen durch Abwischen mit Tüchern, die mit Desinfektionslösungen benetzt wurden, desinfiziert werden; ja es ist von vorneherein darauf zu achten, daß sich im Laboratorium keine Gegenstände befinden sollen, die eine solche Behandlung nicht vertragen würden. Die Desinfektionskraft von Anstrichfarben und Fußbodenbelag ist, wie oben erwähnt, unzuverlässig. Sublimatlösungen dürfen mit blankem Metall nicht in Berührung gebracht werden.

Um solche Desinfektionen jederzeit rasch ausführen zu können, müssen sich größere Vorräte der genannten Desinfektionslösungen in der Nähe des Arbeitsplatzes, am besten beim Waschtische in größeren Mengen vorrätig befinden. Infizierte Kleider sind nach bekannten Desinfektionsprinzipien zu behandeln, die hier nicht ausführlicher dargelegt werden können.

Auch die Hände des Mikrobiologen werden nicht selten versehentlich infiziert und sie sind nach jeder Verrichtung im mikrobiologischen Laboratorium als infektionsverdächtig zu betrachten. Für diese hygienische Desinfektion der Hand sind ganz andere Grundsätze maßgebend als für ihre erstrebte Sterilisierung, die sog. chirurgische Händedesinfektion (*Henke, Döderlein, Speck, Graßberger*¹ [S. 242 u. ff.], *Neufeld*). Während dort eine bloße Fixierung aller Keime auf der Hand oft genügt, und eine Reinigung der Hand von den leicht entfernbarren Keimen der etwaigen Anwendung von Desinfektionsmitteln vorauszugehen hat, ist hier die Abtötung der die Hand infizierenden Keime unbedingt erforderlich und auch immer möglich, weil die frisch auf die Haut gebrachten Keime oberflächlich sitzen (*Henke, Seitz, Speck*) und die Desinfektion muß hier vor jeder Reinigung erfolgen, schon um nicht in den Schmutzwässern neue erst noch zu desinfizierende Massen zu schaffen.

Zur hygienischen Händedesinfektion dienen gewöhnlich auch die oben genannten stets vorrätig zu haltenden Lösungen, auf deren Ein-

wirkung durch entsprechend lange Zeitdauer — für vegetative Formen dürften 2 Minuten der obigen Lösungen zumeist genügen — genauestens zu achten ist. Die gewöhnliche Anwendungsweise ist im allgemeinen viel zu kurzfristig, besonders gilt dies auch für Formaldehyd — oder wasserstoffsuperoxydhältige Desinfektionsmittel, die oft wegen der neben Sublimat und Kresolkörpern geringeren Geruchs- und Giftwirkung bevorzugt werden. Häufig wiederholte Sublimatbenetzung der Hände ergibt eine HgCl_2 -Imprägnation der Haut, die einen guten Schutz gegen darauf gebrachte pathogene Keime bildet (*Kroenig* und *Blumberg, Speck*), jedoch von HgCl_2 -empfindlichen Personen nicht ertragen wird. In gleicher Weise wie die Hand sind etwa infizierte Teile der Gesichtshaut zu behandeln.

Nicht selten bildet den Anlaß von Laboratoriumsinfektionen auch eine Infektion der Mundhöhle, besonders durch Aufsaugen infektiöser Flüssigkeiten in Pipetten. Bei der Verhütung solcher Zufälle spielt Übung und Geschicklichkeit die Hauptrolle. Sog. automatische Pipetten werden offenbar wegen des damit verbundenen Zeit- und Kostenaufwandes nur wenig verwendet. Beim Pipettieren hochinfektiöser Flüssigkeiten empfiehlt es sich, wenigstens für Anfänger, den Mund durch Wattevorlagen, die in den oberen Pipettenteil gesteckt werden, zu schützen. Bei Capillarpipetten können Gummisaugkappen verwendet werden. Ist die Infektion der Mundhöhle einmal gegeben, so ist zunächst für gründliche Reinigung durch Spucken und Spülen zu sorgen, wobei jedoch zu beachten ist, daß die ausgeworfenen Flüssigkeitsmengen unbedingt noch als desinfektionsbedürftig zu behandeln sind, also in ein geschlossenes Waschbecken einen Kübel oder Topf, nicht in ein Becken mit Ablauf zu speien sind. Die Mundhöhle selbst kann nach der gründlichen Spülung noch einer Desinfektion etwa durch minutenlange Einwirkung einer 2%igen Kreselseifen-, 1%igen H_2O_2 - oder KMnO_4 -Lösung ausgesetzt werden.

Die Anwendung eines Vollbades als Desinfektionsmaßregel für den mikrobiologischen Arbeiter kommt kaum in Betracht, da die bedeckte Haut oder auch nur die tiefen Kleiderschichten kaum jemals der Infektion ausgesetzt und in besonderen Fällen einer lokalen Desinfektionsbehandlung zu unterziehen sind. Ein Vollbad würde in solchen Fällen nur neue schwer desinfizierbare Objekte: Wasser und Badewanne, ergeben. Wenn trotzdem für die Anlage sog. Pestlaboratorien Badeeinrichtungen zumeist verlangt werden, so handelt es sich hier um einen sachlich nicht gerechtfertigten Luxus.

Besonders schwierig wird die Desinfektion im Laboratorium, wenn eine feintröpfchenförmige Verstreuerung infektiöser Flüssigkeiten in der Luft erfolgt ist. Dies kommt am leichtesten beim Zentrifugieren infektiöser Flüssigkeiten durch plötzliche Störungen des Ganges, die ein Zerbersten von Gefäßen mit sich bringen, zustande. In solchen Fällen empfiehlt es sich, wenigstens bei hochinfektiösen Erregern, den

Raum schleunigst zu verlassen und zu versperren und sofort Oberkleider, unbedeckte Hautstellen und Mundhöhle zu desinfizieren. Der infizierte Raum wird dann durch Einleitung vom Formaldehyddämpfen durch das Schlüsselloch oder auch durch Einstellen eines Formaldehydapparates nach längerem Ruhigstehen der Zimmerluft desinfiziert.

Endlich bilden die Versuchstiere und das Ungeziefer eine nicht zu unterschätzende Gefahr der Laboratoriumsinfektion. Schon bei Haltung lebender infektiöser Tiere ist größte Vorsicht am Platze: Sicherung gegen Entlaufen, Auffangung und Desinfektion der Abgänge, Befreiung der noch uninfizierten Tiere von Ungeziefer, besonders von Flöhen durch Kämmen nach Äther- oder Benzinbenetzung, Verwendung ungezieferdichter Käfige aus Glas mit Watteverschluß, besonders bei Pest- und Rückfallfiebersversuchen. Beim *Pfeifferschen* Versuch ist sehr zu beachten, daß das Fell der Tiere, das Innere der Käfige und die diese Objekte berührenden Instrumente und Hände mit Cholerakeimen infiziert zu sein pflegen. Bei der Obduktion der Kadaver infizierter Tiere sind alle infizierten Geräte sofort zu kochen und die Kadaverteile zu desinfizieren, am besten zu verbrennen, jedoch auch bis dahin einwandfrei zu versorgen, mindestens zu bedecken. Die Anwesenheit von Fliegen im mikrobiologischen Laboratorium bildet eine große ständige Gefahr, besonders bei Gegenwart von infizierten Versuchstieren in Käfigen und während der Obduktion solcher. Ein ständiger Kampf gegen diese Tiere durch Fallen und Fangmittel aller Art, sowie Verwahrung von Türen, Fenstern und Ventilationsöffnungen erscheint dringend geboten.

II. Mikrobiologische Prüfungsmethoden von Entkeimungsverfahren.

Nicht nur die im ersten Kapitel genannten, im mikrobiologischen Laboratorium zur Anwendung gelangenden, sondern auch alle anderen sonstwo geübten Entkeimungsverfahren, wie: Sterilisation von chirurgischen Geräten und Verbandstoffen. Wasser, Nahrungsmitteln, Arzneimitteln, Desinfektion von Personen, Räumen und Möbeln, Kleidung und Wäsche, Ausscheidungen und Abfallstoffen, Tieren, Waren u. a., verlangen eine Prüfung ihrer Wirksamkeit mit mikrobiologischen Methoden. Das Verlangen ist schon begründet in der Kostspieligkeit und Umständlichkeit vieler solcher Verfahren, die eben nur unter der Voraussetzung ihrer festgestellten und auch im Zweifelsfalle immer wieder feststellbaren Wirksamkeit als angezeigt gelten können. Es wäre unnötig das zu betonen, hätten nicht auch heute noch so manche von den zu einschlägigen Zwecken tatsächlich angewendeten Verfahren, besonders sog. Desinfektionsverfahren in aufgeregten Epidemiezeiten, mehr den Charakter von abergläubischen Zauberhandlungen von rein symbolischer Bedeutung, als den zielbewußten Handelns. Das Verlangen gründet sich aber besonders auch auf die mit mangelhafter

Keimfreiheit oder Desinfektionswirkung in vielen Fällen verknüpften Nachteile und Gefahren.

Es ist zu unterscheiden zwischen der ersten Prüfung eines Verfahrens, seiner Aufstellung, zu der natürlich auch alle Nachprüfungen bis zur einwandfreien Feststellung der Wirksamkeit gehören, und seiner fortlaufenden Kontrollierung. Bei der ersteren können nur mikrobiologische Versuche eine Entscheidung bringen, ja auch in der vorbakteriologischen Zeit waren die gesammelten Erfahrungen über das Ausbleiben oder Eintreten von Zersetzungen und Infektionen nach bestimmter Verfahrungsweise eigentlich mikrobiologische Untersuchungen. Die fortlaufende Kontrolle jedoch erfordert solche nicht unbedingt, sie kann sogar in den meisten Fällen mit Vorteil durch physikalische und chemische Methoden, die die Einhaltung der verlangten Bedingungen — besonders Temperaturen, Konzentrationen und Zeiten — kontrollieren, ersetzt werden. Diese zahlreichen nichtmikrobiologischen Methoden der Entkeimungskontrolle können hier nicht ausführlich erörtert werden, wo nur von mikrobiologischen Aufgaben die Rede sein soll. Sie sind vom Mikrobiologen nötigenfalls in den modernen Handbüchern der Desinfektionslehre (*Graßberger*¹, *Croner*²) oder im Referate *Czaplewskis*¹ auf dem Berliner Hygienekongreß 1907 nachzulesen. Immerhin kommen aber auch für die fortlaufende Kontrolle der Entkeimungsverfahren mikrobiologische Methoden in Anwendung, die im folgenden darzulegen sind. Diese praktischen Prüfungsmethoden, die bloß das zu erwartende Eintreten eines Entkeimungsvorganges für den Einzelfall, meist nur für Stichproben, bestätigen sollen, seien, obwohl die Feststellung eines Verfahrens seiner Kontrolle vorausgeht, hier vor jener wissenschaftlichen Prüfung dargelegt, weil sich die ersteren besser an die praktischen Entkeimungsmethoden des ersten Kapitels anschließen, die letzteren aber schon zu den Forschungsmethoden des dritten Kapitels überleiten.

1. Praktische Kontrollmethoden.

a) Kontrolle der Sterilität.

Bei Prüfungen auf Keimfreiheit ist im allgemeinen zu beachten, daß ein Kulturversuch mit negativem Ergebnis nicht die Keimfreiheit schlechthin, sondern nur die Abwesenheit solcher Keime beweist, die unter den gewählten Kulturbedingungen wachsen. So können Fehler der Beurteilung entstehen, wenn nur einerlei Nährboden und einerlei Temperatur herangezogen wird. Die Fehlergefahr ist jedoch erfahrungsgemäß gering, wenn Normalbouillon als Nährmedium und Temperaturen von 20 und 37° gewählt werden. Soll eine Zählung der etwa doch vorhandenen Keime stattfinden, so wird im allgemeinen anstatt Bouillon Gelatine oder Agar verwendet. Nach dem von *Krombholz*² angegebenen Prinzip ist es aber auch möglich, in Flüssigkeiten Keimzäh-

lungen ausreichend genau vorzunehmen. Die Gelatine oder der Agar ist mit dem zu untersuchenden Material bei einer Temperatur von 25 oder von 42° sorgfältig zu beschicken, dann auf Platten zu gießen. Oberflächenkultur ist nur in manchen Fällen ausreichend. Zum Sterilitätsnachweis ist grundsätzlich immer, aber auch praktisch häufig, eine zweite Kultivierung unter Ausschluß des Luftsauerstoffes erforderlich.

Die Prüfung auf Keimfreiheit von *Geräten*, wird, wenigstens als gelegentliche Stichprobe, dann am Platze sein, wenn solche nicht im eigenen Betrieb, Laboratorium, Apotheke, Spital od. dgl. sterilisiert, sondern in sterilisiertem Zustande von auswärts bezogen werden.

Gefäße können durch Eingießen steriler Nährlösungen und durch nachfolgende Bebrütung geprüft werden. Feste Gegenstände, besonders Operationsinstrumente, werden zur Prüfung unter sterilen Kauteln mit Wattebäuschen abgewischt, die dann der Kultur zu unterwerfen sind.

Chirurgische Verbandstoffe, die als sterilisiert bezogen werden, erscheinen im allgemeinen besonders bedürftig, einer ständigen Kontrolle auf Keimfreiheit unterzogen zu werden (*Graßberger*¹ [S. 179],² [S. 105]). Hier ist in Anbetracht des Verwendungszweckes auch die Heranziehung anaerober Kulturverfahren dringend wünschenswert. Die Kultur geschieht in einfacher Weise durch Eintauchen, Schütteln und Bebrüten der Prüfungsstücke in Bouillon oder Agar.

Auch zur Prüfung der Hände auf Keimfreiheit oder -armut (*Paul u. Sarway, Graßberger*¹ S. 238 u. ff.) werden zumeist sterile Faserstoffe wie Watte oder Seidenfäden mit der Haut in intensive Berührung gebracht, z. B. durch den Nagelfalz gezogen und dann der Kultur zugeführt. Von besonderem Interesse ist, ob nach dem bei vielen Operationen vorkommenden längerdauernden Aufweichen der Haut durch energisches Abschaben lebensfähige Keime gefunden werden können. Bei allen solchen Untersuchungen ist auf die naheliegende Gefahr der Luftverunreinigung durch besondere Maßregeln Rücksicht zu nehmen. Die Schwierigkeit ihrer Ausschließung läßt hier die Anwendung von Agar gegenüber der von Bouillon bevorzugen, damit die Anwesenheit einzelner Keime von der vieler unterschieden werden könne.

Die Sterilität von *Nährböden* kann am leichtesten durch deren Bebrütung festgestellt werden, natürlich nur relativ, für die gegebenen Bedingungen, was aber hier zumeist auch schon genügt, weil eben das Auftreten anderer auch für die Kultur selbst nicht zu erwarten ist.

Hitzeempfindliche Nährböden und andere Lösungen und Suspensionen (Sera, Ascites, Impfstoffe, Fermente, Preßsäfte, Extrakte, Pharmaka), die nur durch die diskontinuierliche Erwärmung nach *Tyndall* oder durch Zusätze unschädlicher oder wieder zu beseitigender Mengen von chemischen Desinfektionsmitteln (Carbol, Phobrol, Chloroform, H₂O₂, Säure, Formaldehyd, Glycerin u. a.) sterilisiert werden können, sind naturgemäß einer Überprüfung ihrer Sterilität einerseits

wegen der minderen Zuverlässigkeit solcher schonender Einwirkungen, anderseits wegen der mit ihrer Verwendung in nichtsterilem Zustande verknüpften Gefahren besonders bedürftig. Hier wird die Kultivierung von Proben jeder einzeln dem Sterilisationsverfahren unterworfenen einheitlichen Flüssigkeitsmenge am Platze sein. Bei Impfstoffen sind zweierlei Feststellungen zu unterscheiden: 1. ob die darin enthaltenen Krankheitserreger nicht noch am Leben, z. B. bei Pest, bzw., wo wir die Erreger nicht genügend kennen, wie bei Lyssa, nicht noch pathogen sind: 2. ob der Impfstoff frei von akzidentellen, verunreinigenden Keimen ist. Nur der letzte Nachweis kann ausreichend durch die Kultur in oder hier auch auf Agar oder in Bouillon erbracht werden, für den ersteren muß in manchen Fällen, z. B. bei Lyssa, kann in anderen, z. B. bei Pest, Paratyphus, auch der Tierversuch herangezogen werden, der dort das einzige bekannte, hier manchmal ein feineres Reagens auf das Überleben der Keime vorstellt, als die Kultur. Wo chemische Zusätze die Sterilität bewirken oder auch sonst vorliegen, muß zur mikrobiologischen Prüfung der Keimfreiheit der Zusatz auf geeignete Weise entfernt oder neutralisiert werden, so durch Abdunstung im Vakuum, fermentative Zerlegung, chemische Bindung, wo zugänglich, auch durch starke Verdünnung mit Nährlösung.

Die Prüfung auf Keimfreiheit von Nahrungsmitteln kommt für frische Nahrungsmittel seltener in Betracht als für Konserven. Frisches Fleisch gesunder Tiere ist in den inneren Teilen, wenigstens größerer Muskel keimfrei. Der Nachweis dieses Zustandes kann zur Entscheidung über die Freigabe von Schlachtfleisch oder über die Anwendung von Schutzmaßregeln (Kochen, Dämpfen) herangezogen werden. Er ist durch Kultur meist nicht rasch genug, wohl aber oft schon durch mikroskopische Ausstrichpräparate ausreichend zu erbringen. Das Hauptaugenmerk ist bei solchen Untersuchungen auf die Verhütung zufälliger Verunreinigungen zu legen. Ein gleiches gilt, wenn zur Heranziehung frischen Fleisches als Nährboden bestimmter Mikroorganismen (z. B. anaerober Bakterien) Stücke aus größeren Muskelpartien frischen Schlachtfleisches gewonnen und ein Teil von ihnen auf Sterilität geprüft werden soll. Die Entnahmeanstrumente müssen sterilisiert, aber auch die Oberfläche, durch die eingeschnitten werden soll, muß unmittelbar vorher durch ein zum Glühen erhitztes Eisenblech von 5 cm Durchmesser energisch abgebrannt werden.

Die nur bei Einhaltung besonderer Sicherungen zu erwartende Keimfreiheit der frischen Milch kann, wie bei anderen Nährböden, durch deren Kultivierung oder durch Verteilung einer entsprechenden Menge in Agar und deren Kultur kontrolliert werden.

Die Sterilitätsprüfung konservierter Nahrungsmittel erscheint am häufigsten bei Büchsenkonserven erforderlich, wo in Anbetracht des Luftabschlusses und des Vorkommens giftbildender Anaerobier (*Bacillus botulinus*) auch die anaerobe Kultur anzuwenden ist. Die

Büchsen werden zunächst einer Vorkultur in geschlossenem Zustande unterworfen, indem sie durch Tage in Bruttemperatur gebracht werden. Das Öffnen geschieht unter sterilen Kautelen: vorsichtiges Abflammen, sterilisierter Konservenöffner. Der Inhalt ist mikroskopisch zu untersuchen und in jedem Fall auch einer aeroben und anaeroben Kultivierung zu unterziehen. Es empfiehlt sich in vielen Fällen, die verschiedenen Bestandteile einer Konserve: Fett, Fleisch, Saft u. a. getrennt bakteriologisch zu verarbeiten, besonders, wenn die Ursache mangelhafter Sterilität ermittelt werden soll. Zu beachten ist für die Beurteilung der Ergebnisse, daß auch gleichartige Keime je nach dem Substrate, auf dem sie wachsen, sehr verschiedene Widerstandsfähigkeit aufweisen (*Kneubühler*).

Sollen irgendwelche praktisch angewandte Sterilisationsmethoden unter besonders strengen Bedingungen geprüft werden, wie das bei Verbandstoff-, Nährboden- und Konservensterilisation von Zeit zu Zeit als dringend wünschenswert zu bezeichnen ist, so verwendet man schwer sterilisierbare Testobjekte, die leicht wiederzufinden und auf Sterilität zu prüfen sind: wie Gartenerde oder Seidenfäden, Leinwandlappchen od. dgl., an denen Aufschwemmungen von Reinkulturen hoch-resistenter Sporenkeime angetrocknet sind. Gewinnung und Prüfung solcher Testkeime wird in einem späteren Abschnitte behandelt.

b) Kontrolle der Desinfektion.

Die Verfahren zur fortlaufenden Kontrolle der praktischen Desinfektionsmethoden haben vorwiegend nichtmikrobiologischen Charakter. Es ist die Einhaltung der als wirksam bekannten Bedingungen durch sachverständige Personen, zunächst: ausgebildete Desinfektoren, dann hygienisch und technisch gebildete Amts-, Spitalsärzte oder andere Inspektoren, zu überwachen. Der Fachhygieniker erscheint hier als letzter Gutachter in besonderen Fällen, wobei aber auch meist nicht gerade an seine mikrobiologischen Fähigkeiten appelliert wird. Das beruht darauf, daß im allgemeinen der konkrete Nachweis der pathogenen Mikroorganismen zu schwierig und unsicher ist, um als Grundlage für praktische Entscheidungen dienen zu können. Zur Desinfektion gelangen in der Praxis zumeist nicht als infiziert befundene oder erwiesene, sondern verdächtige Gegenstände. Der negative Nachweis natürlichen Vorkommens der Erreger könnte also die Wirksamkeit eines angewendeten Verfahrens nicht beweisen. Nur in ganz bestimmten Fällen ist dergleichen möglich und angezeigt: Wenn ein erweislich mit Milzbrandsporen behaftetes Objekt, etwa ein tierischer Rohstoff, einem Desinfektionsverfahren unterworfen wird, dessen Wirksamkeit von schwer voraussehbaren praktischen Umständen abhängt, so kann eine neue Untersuchung des desinfizierten Materials erwünscht oder entscheidend sein. Auch in den ganz seltenen Fällen einer wirk-

lichen Abwasserdesinfektion kann eine Kontrolle des Endproduktes — bei städtischem Abwasser etwa auf Choleravibrionen, Typhus- oder einfacher auf Colibakterien, bei Gerbereiabwässern auf Milzbrandkeime — erforderlich werden. Die Durchführung solcher Untersuchungen hätte nach den allgemeinen bakteriologischen Methoden unter Berücksichtigung etwaiger Störungen durch Reste des Desinfektionsmittels zu erfolgen. Für bakteriologische Abwasserkontrolle empfiehlt sich besonders das Colizählverfahren nach *Krombholz*², für das Aufsuchen von Milzbrandkeimen die von *Reichel*³ beschriebene Methode.

In anderen Fällen erscheint es angezeigt, die laufende technische Kontrolle des Verfahrens durch den mikrobiologischen Nachweis zu ergänzen, daß künstlich hinzugefügte Krankheitserreger oder auch andere Bakterien von bekannten Eigenschaften den Prozeß tatsächlich nicht überlebt haben. Dies gilt insbesondere von der Kontrolle der Dampfdesinfektion (*Graßberger*¹, S. 173—183). Als Testmaterial dienen an Seidenfäden, Papier, Leinen angetrocknete Sporensuspensionen, früher allgemein von Milzbrandkeimen, jetzt häufiger von anderen, u. zw. saprophytischen Sporen, deren nicht über 15 Minuten hinausgehende Dampfresistenz entweder erprobt oder durch Vorbehandlung mit Dampf durch kürzere als die Abtötungszeit eingestellt wird (*Weil*², *Hoffmann*³). Diese Testobjekte werden in staub-, aber nicht dampfdichte Hüllen, Watte oder ungeleimtes Papier, verpackt und können so auch durch Laien nach Vorschrift verwendet und nach dem Gebrauch dem Laboratorium zugesendet werden (*Hoffmann*³, *Hüne*¹). Auch bei Raumdesinfektionen können durch Auslegen von Testobjekten ähnliche Methoden der mikrobiologischen Kontrolle geübt werden. Sie empfehlen sich besonders dort, wo die Anwendbarkeit der Methode durch Nebenumstände wie: schlechte Abdichtbarkeit oder Unheizbarkeit eines Raumes problematisch erscheint, um zu einem Urteil über den Wert des Vorgehens zu kommen.

2. Wissenschaftliche Prüfungsmethoden.

a) Allgemeine Anforderungen.

Die wissenschaftliche Feststellung der Schädigung lebender Mikroorganismen durch bestimmte Einflüsse geschieht in ihrem entscheidenden Teile stets mit mikrobiologischen, sonst aber auch vielfach mit anderen naturwissenschaftlichen, besonders physikalischen und chemischen Methoden und ist immer als Ganzes Aufgabe des Mikrobiologen, so daß dieser nicht nur die darauf gerichteten Methoden seines Spezialfaches, sondern auch die genannten nichtmikrobiologischen Arbeitsweisen kennen und ausreichend beherrschen muß.

Es handelt sich im allgemeinen um die Festlegung der Bedingungen, Ursachen und Umstände, durch die das Wachstum von Mikro-

organismen zuverlässig unterbleibt, sei es unter Fortbestehen jener Bedingungen als Ausdruck einer „Entwicklungshemmung“, sei es nach ihrem Aufhören als Zeichen der erreichten „Desinfektion“ oder „Sterilisation“ (*Koch*¹).

Nicht selten wird statt des unterbleibenden Wachstums auch bloß die Abschwächung (*Maillard*) oder Verzögerung, von *Koch*¹ Wachstumsbehinderung im Gegensatz zur Entwicklungshemmung genannt, oder die Alteration einer Leistung, wie: Gärung (*Bial*), Farbstoffbildung (*Aschkinas* und *Caspari*^{1, 2}), Pathogenität (*Arloing*¹), Giftigkeit (*Werner*) oder morphologischer Charaktere, wie: Färbbarkeit (*Bürgers*, *Schermann* und *Schreiber*, *Henry-Cernovodeanu* und *Henry*), der Besitz *Babes-Ernstscher* Körperchen (*Marx*) Gegenstand exakter Beobachtung: es geht aber nicht an, solche Ergebnisse als Desinfektionswirkungen oder als Entwicklungshemmung zu bezeichnen.

Benecke geht S. 486 von dem *Kochs*chen Hemmungsbegriff ohne Not ab, wenn er sagt, die Hemmung könne doch auch von der Zeit abhängen, einerseits indem sie allmählich in Tötung übergehe, anderseits indem sie überwunden werde. Der erstere Fall ist langfristige Tötung, der letztere Behinderung im Sinne *Kochs*. Auch *Schneider* und *Seligmann*, *Arzt* und *Kerl* und andere nennen Wachstumsverzögerungen gelegentlich Hemmung, anscheinend jedoch ohne damit eine Begriffsumbildung vorschlagen zu wollen.

Demgemäß sind zwei Haupttypen von Versuchen: der Hemmungsversuch und der Desinfektionsversuch, richtiger „Tötungsversuch“ zu unterscheiden. Bei ersterem erfolgt die Einwirkung der Schädlichkeit dauernd und unter Bedingungen, die im übrigen eine Entwicklung gestatten, also in einem Kulturmedium; bei letzterem erfolgt sie zeitlich begrenzt und zumeist in einem Kulturmedium, in das die Keime erst nachträglich gelangen müssen.

Die Intensität der wirkenden Schädlichkeit muß selbstverständlich in beiden Fällen genau festgestellt werden. Das Ergebnis des Hemmungsversuches: der „Hemmungswert“, ist dann eine reine Konzentrations- oder sonstige Intensitätsangabe, deren Höhe naturgemäß nicht nur von der Art der Keime und des Antisepticums, sondern auch von allen Milieubedingungen: neben der immer wichtigen Temperatur auch von der Art und dem Mengenverhältnisse der Nährstoffe, abhängen muß. Das Ergebnis des Desinfektionsversuches aber, der „Tötungs-“ oder „Desinfektionswert“, ist dagegen eine kombinierte Konzentrations(Intensitäts-)Zeitangabe, deren Größe nicht notwendig von etwas anderem abhängt, als von der Beschaffenheit der Keime und des Desinfektionsmittels und der Temperatur während der Einwirkungsdauer.

Allerdings werden auch für die Abtötung der Keime alle Nebenumstände von Bedeutung sein, unter denen die Einwirkung erfolgt und je nach dem Verhalten zu diesen Umständen sind wieder zwei Arten von Tötungsversuchen grundsätzlich klar zu unterscheiden: auf der einen Seite der reine, exakte Tötungsversuch, dessen Aufgabe es ist, die Wirkung und ihr Objekt so scharf als möglich zu fassen, und Störungen durch Nebenumstände auszuschalten oder durch planmäßige Variation

zu studieren, auf der andern Seite der angewandte oder praktische Versuch, der die vorkommenden Schwierigkeiten, die sog. natürlichen Bedingungen berücksichtigt und nachahmt und das Maß der dadurch bedingten Unvollkommenheit der tatsächlichen Wirkung feststellt.

Diese letzteren Versuche nähern sich ohne Grenze den im vorausgehenden Abschnitte beschriebenen Untersuchungen des Erfolges von praktischen Sterilisations- und Desinfektionsverfahren. Sie bilden, systematisch angestellt und kritisch verwertet, einen unentbehrlichen Teil der wissenschaftlichen Grundlagen für die Beurteilung des Wertes bestimmter Verfahren für die Praxis. Bei allen praktisch wichtigen Desinfektionsverfahren: bei Trinkwasserreinigung, Milchentkeimung, Dampf-, Raum-, Haut-, Stuhl-, Abwasser- und Felldesinfektion ist die Aufstellung und Empfehlung neuer Verfahren auch an ihre praktische Erprobung, an die Feststellung der ausreichenden Wirksamkeit in Versuchen, die den praktischen Verhältnissen entsprechen, geknüpft. Denn in allen diesen Fällen liegen bei der Ausführung des Verfahrens Umstände vor, die die Bedingungen der einwirkenden Schädlichkeit in unvorhersehbarer Weise verändern oder ihnen doch einen Teil der Keime in verschiedenem Maße entziehen können.

Solche Versuche sind jedoch offenbar ganz ungeeignet, die Wirksamkeit des verwendeten keimfeindlichen Einflusses selbst festzulegen, d. h. die Aufgabe der reinen Versuche mitzuübernehmen. Vielmehr sind beide Typen von Versuchen strenge zu trennen. Es geht nicht an, dem Umstande, daß in der Praxis oft unüberblickbare Komplikationen eintreten, dadurch beikommen zu wollen, daß man auch gleich die Untersuchung auf die Wirksamkeit eines Einflusses unüberblickbar kompliziert gestaltet. Oft haben überdies die Unvollkommenheiten des Versuches und der Anwendung, mit der sein Ergebnis verglichen wird, so geringe Ähnlichkeit, daß dem Vergleiche jede Beweiskraft abzusprechen ist.

Der angewandte Versuch entscheidet also über den praktischen Wert oder Unwert eines Verfahrens, aber nur der reine Versuch kann dazu dienen, den Desinfektionswert eines Mittels oder Einflusses, d. h. eine Maßzahlbeziehung zwischen seiner Konzentration oder sonstigen Intensität und der von den Keimen eben nicht mehr überlebten Einwirkungsdauer festzustellen.

Rapp will die Desinfektionskraft eines Mittels an seiner Wirksamkeit in dosi refracta messen, indem er die für sich unzulängliche Einwirkung „auf ihrer Höhe“ wiederholt. Was *Friedenthal* als „Desinfektionskraft“ definiert: die Anzahl der Liter Nährflüssigkeit, die durch die Gewichtseinheit („absolute“) oder durch die für einen Frosch letale Dosis („relative Desinfektionskraft“) dauernd steril zu halten ist, wäre richtiger als ein reziproker Hemmungswert zu bezeichnen, der jedoch mit der Natur der Nährstoffe stark variieren müßte. Auch kann die Giftigkeit für den Frosch nicht als Maß für die Keimfeindlichkeit gelten. Beide Autoren haben bei ihren Definitionen offenbar nur eine „innere Desinfektion“ im Auge, die überhaupt viel Verwirrung anstiftet.

Der Desinfektionswert eines Mittels ist nur bestimmten Keimen gegenüber meßbar und für zwei Mittel nur dann vergleichbar, wenn er gleichen Keimen gegenüber unter gleichen Umständen gemessen ist. Ein Mittel kann nicht schlechthin hohen oder niedrigen Desinfektionswert besitzen, sondern eben nur bezogen auf bestimmte Keime, die Testkeime. Die Widerstandsfähigkeit dieser letzteren, ihre Resistenz, ist die eben noch überlebte Einwirkungsdauer des Mittels, die naturgemäß von dessen Art und Intensität abhängt. Als Testmaterial sind hier Reinkulturen wohlcharakterisierter Keime zu verwenden, deren Resistenz gegenüber bekannten, einfachen Schädlichkeiten, wie strömendem Dampf, Phenol, Formaldehyd, festgestellt und immer wieder leicht feststellbar sein muß. Eine solche erneute Resistenzprüfung des Testmaterials bildet als Kontrollversuch einen unentbehrlichen Teil des exakten Desinfektionsversuches und ist am besten in jedem Falle demjenigen Mittel gegenüber vorzunehmen, das der zu prüfenden Schädlichkeit am nächsten steht.

Die Exposition der Testkeime gegenüber der Schädlichkeit soll im exakten Versuche störende Nebenumstände vermeiden, besonders solche, die eine ungleichmäßige Exposition der Einzelkeime bei dem zu prüfenden Einflusse mit sich bringen, wie: das Antrocknen vieler Keime in dicker Schichte, die natürliche Lagerung oder eine nachträgliche Verklumpung von Keimen, oder auch solche Umstände, die den Keimen einen unbekannten Schutz gewähren, wie die Gegenwart fremder, besonders organischer Stoffe in Lösungen, endlich selbstverständlich auch Umstände, die die wirksame Intensität der geprüften Einwirkungen in unkontrollierbarer Weise verschieben, wie es oft durch Lösungsgeossen in Flüssigkeiten oder auch sonst durch Temperatur-, Feuchtigkeitsschwankungen und anderes der Fall ist. Das Antrocknen der Testkeime an indifferente Unterlagen kann nicht grundsätzlich abgelehnt werden, schon weil die Exposition in gasförmigen Phasen auf andere Weise nicht zu bewerkstelligen ist, aber auch, weil die Exposition trockener Testkeime die scharfe Unterbrechung der Einwirkung erleichtert. Die Exposition der Testkeime in gleichmäßig feiner Suspensionsverteilung verdient jedoch den Vorzug überall dort, wo sie ohne andere schwerwiegende Nachteile möglich ist.

Ferner muß die Exposition eine scharf begrenzte sein: die schädliche Einwirkung muß rasch und vollständig aufhören. Die Erfüllung dieser Forderung stößt bei chemischen Desinfektionswirkungen und -mitteln auf große Schwierigkeit. In manchen Fällen erweist sich eine einfache Beseitigung der keimfeindlichen Stoffe durch Spülung, ja auch ihre bloße Verdünnung durch die Kulturmedien als ausreichend, in anderen muß eine besondere Giftbindung, eine chemische Neutralisation oder eine Bindung durch Adsorptions- und Absorption, d. h. durch Oberflächen- und Lösungskräfte Platz greifen. Bei chemischer Neutralisation ist zu fordern, daß weder das Neutralisationsmittel noch das

Reaktionsprodukt in den in Betracht kommenden Konzentrationen selbst entwicklungshemmend wirke und daß die Reaktion zu einer irreversiblen Ausschaltung des Giftes, nicht bloß zu einem beweglichen Gleichgewichte führe. Solche Methoden bezwecken zunächst zu verhüten, daß Reste des Giftes in der Nachkultur eine entwicklungshemmende Wirkung ausüben und dadurch eine Abtötung bloß vortäuschen. Die Verfeinerung der Methodik führt aber ohne feststellbare Grenze auch weiter: zu einer therapeutischen Behandlung der vergifteten aber noch nicht abgestorbenen Keime, einer Entgiftung der Keime selbst. Genau genommen wäre, wo solche eigentliche Entgiftungsverfahren unterbleiben, beim Desinfektionsversuch nicht vom Eintritt des Todes, sondern vom Eintritt einer tödlichen Vergiftung der Keime zu sprechen. Dieser Zustand, eine Art Scheintod oder relative Desinfektion, relativ zu den Umständen in welche die Keime nach der Exposition geraten, ist zwar grundsätzlich, aber kaum in jedem Falle tatsächlich von einer Entwicklungshemmung durch Giftreste in der Nachkultur zu unterscheiden und wurde auch mehrfach ausdrücklich als Hemmung bezeichnet, was kaum zweckmäßig erscheinen kann.

Die der Kultivierung zuzuführende Zahl von Testkeimen muß ferner eine ausreichend große sein, um die Anwesenheit maximal resistenter Keimindividuen zu sichern. Die weitergehende Forderung nach einer in jedem Falle gleichen Keimzahl für vergleichbare Versuche erscheint nicht berechtigt, doch muß der Nachweis verlangt werden, daß eine Keimzahl erreicht oder überschritten wurde, von der an mehr keine Abhängigkeit zwischen Keimzahl und Resistenz besteht. Natürlich muß die Zahl der verwendeten Testkeime in allen Versuchen festgelegt werden.

Endlich ist zu fordern, daß die Nachkultur unter optimalen Bedingungen, besonders bezüglich Zusammensetzung des Nährbodens, Acidität und Temperatur erfolge, weil ja andernfalls der Nachweis des eingetretenen Todes oder der Tödlichkeit der eingetretenen Vergiftung der Keime nicht als erbracht gelten kann. Da aber bei der unendlichen Mannigfaltigkeit der möglichen Nährstoffkombinationen die optimalen Kulturbedingungen immer nur als die besten bekannten erfaßt werden können, so erleidet auch dadurch, wie schon durch die offene Möglichkeit unbekannter oder unangewendeter Entgiftungsverfahren der scharfe Begriff der Tötung der Keime im Desinfektionsversuch eine gewisse Einschränkung: die Tötung bleibt immer relativ zu den angebotenen Kulturbedingungen.

Zusammenfassend kann gesagt werden: in exakten Desinfektions- oder Keimtötungsversuchen muß ein genau bekanntes, geeignetes Testmaterial von Mikroorganismen der zu prüfenden genau dosierten Schädlichkeit gegenüber bei konstanter Temperatur und unter Vermeidung oder Berücksichtigung störender Nebenumstände, gleichmäßig, d. h. für jedes Keimindividuum gleichzeitig und gleichstark,

exponiert und die Wirkung auf die Entwicklungsfähigkeit der Keime nach peinlich genauer Beseitigung der Schädlichkeit, fallweise nach Anwendung der möglichen Gegenmittel, durch Herstellung der als beste bekannten Entwicklungsbedingungen der Beobachtung zugänglich gemacht werden.

Koch¹ hat als erster (1881) eine Versuchsanordnung für exakte Desinfektionswertbestimmung angegeben, an die sich auch *v. Behrings*¹⁻³ Feststellungen in der Hauptsache halten. Koch trocknet wässrige Suspensionen von Milzbrandsporen und Staphylokokken, die durch Abschwemmung von Oberflächenkulturen, also unter Vermeidung von Nährstoffbeimengungen gewonnen sind, an Seidenfäden. Dieses, wenigstens bei Milzbrandsporen haltbare Testmaterial, kann tatsächlich in fast allen Fällen leicht der Schädlichkeit exponiert und auch wieder entzogen werden. Es wurde schließlich auf Gelatineoberfläche kultiviert. Die Anordnung verstößt gegen die Forderung voller Gleichmäßigkeit der Exposition und Schärfe ihrer Unterbrechung, da die im Fadeninneren befindlichen Keime durch die Masse der äußeren Keime vor der Berührung mit dem Desinfektionsmittel in gewissem Grade geschützt und auch nicht ganz leicht von Giftresten zu befreien sind, deren Beseitigung ebenso wie die Nachkultur hier noch zu sehr vernachlässigt scheint. Geppert¹⁻³, der 1889 als erster den reinen Versuch vom angewandten klar unterscheidet, und Gruber³, der auf dem internationalen Hygienekongreß in London 1892 über die Wertbestimmung der Desinfektionsmittel referiert, verlangen aus diesen Gründen und wegen der geringen Trockenresistenz der sporenfreien Keime für die Wertbestimmung chemischer, oder richtiger gesagt flüssiger Desinfektionsmittel, grundsätzlich die Exposition der frischbereiteten, filtrierten Suspensionen, u. zw. in bestimmter Dichte und Menge. Vorher hatten schon Hueppe² (1886), *v. Esmarch*² und Liborius (1887) mit ähnlicher Begründung die Verwendung von Bouillonkulturen als Suspensionen empfohlen, womit aber die störende Gegenwart der Nährstoffe bei der Exposition gegeben wäre. Geppert und Gruber³ verlangen in Hinblick auf die Untersuchungen des ersteren über die Sublimatwirkung die sorgfältigste Neutralisation der Giftreste. Die Forderung wurde in der Folge zwar vielfach außer acht gelassen, aber von keiner Seite, außer von Bechold¹ als unberechtigt bezeichnet, der seine Ablehnung mit dem Bestreben begründet, den natürlichen Verhältnissen näher zu kommen, worin jedoch geradezu ein Verzicht auf den entscheidenden Nachweis der Wirksamkeit eines Mittels, selbst auch bei angewandten Versuchen, liegen würde.

Geppert¹ wies auch nach, daß die Hemmungsgrenze für sublimatgeschwächte Keime tatsächlich viel niedriger als für normale liegt, was später auch für Phenol und Formaldehyd bestätigt wurde (*Schneider* und *Seligmann*). Das durch *v. Esmarch*² zum Ausschluß von Täuschungen durch Entwicklungshemmung in der Nachkultur vorgeschlagene Verfahren: nachträgliche Beimpfung steril gebliebener Röhrchen mit frischen Keimen, war damit als unzulänglich erwiesen. Gruber³ setzte an dessen Stelle die Anweisung, von dem frisch beimpften Röhrchen aus sogleich ein zweites zu beimpfen und Heider² konnte zeigen, daß auch wirklich im letzteren Wachstum beobachtet werden kann, während es im ersteren ausbleibt. Immerhin ist aber mit diesem Verfahren eine bedenkliche Verminderung der auf den zweiten Nährboden überimpften Keimzahl verbunden. Die beste Abhilfe schafft das von Grubers Schüler Bellei (1903) und schon vorher (1902) in ähnlicher Weise von Zikes angegebene Verfahren, die suspendierten Keime durch Ausfällung und Abzentrifugieren vom neutralisierten Medium zu trennen. Die Bedeutung hoher Keimzahlen bei der Überimpfung ging aus den Arbeiten Schüders und Ballners² hervor, von denen ersterer wenigstens für gewisse Fälle die Kultivierung aller exponiert gewesenen Keime verlangt.

Für die Nachkultur waren von dem Kochschen Gelatineplattenverfahren schon Hueppe², *v. Behring*³ und *v. Esmarch*³ zugunsten der Bouillonkultur ab-

gegangen, *v. Behring*³ hatte auch die höhere Bebrütungstemperatur (37°) grundsätzlich gefordert und den Zusatz von sterilem Blutserum zu Bouillon als wachstumbegünstigend empfohlen. *Heraeus* säte in flüssige Gelatine ein, womit zum ersten Male auch die Zahl überlebender Keime feststellbar wurde. *Geppert*⁴ machte als erster solche Feststellungen während der Dauer des Desinfektionsversuches durch Anlegung von Agarplatten, er bevorzugt jedoch für die Entscheidung über das Absterben der Keime den Tierversuchen, während durch *v. Behring*³, *H. Hammer* und *Gruber*³, später auch durch *Gegenbauer* und *Reichel* umgekehrt die Kultur auf künstlichen Nährböden als das empfindlichere Reagens auf das Überleben der Keime für bestimmte Fälle befunden wurde. *Gruber*³ betont die Forderung nach optimalen Entwicklungsbedingungen in der Nachkultur und nach lange fortgesetzter Beobachtung solcher Kulturen; er lehnt feste Nährböden als minder günstig ab und verzichtet auf die Zählung der Keime, indem er nur Endversuche, bei denen die Desinfektion auch für die widerstandsfähigsten Keimindividuen erreicht ist, gelten läßt. Die später von *Czaplewski*² und seinem Schüler *Nothen* empfohlene Methodik deckt sich in den Hauptpunkten mit der *Grubers*³.

Inzwischen hat *Paul*¹, zunächst 1896 und 1897 mit *Kroenig*^{1, 2}, später 1907 mit *Prall*, zuletzt 1910 mit *Bierstein* und *Reuß*^{1, 2} eine exakte Methodik aufgestellt und entwickelt. Er hat wiederholt den Anspruch erhoben, sie als die Lösung des Problems der Wertbestimmung chemischer Desinfektionsmittel betrachtet zu sehen und hat damit auch viele Anhänger (*Engels*, *Madsen* und *Nyman*, *Laubenheimer*^{1, 2} u. a.) gefunden. Diese Methodik greift auf die Trocknung der Keime zurück, vermeidet jedoch gröbere Ungleichmäßigkeiten der Exposition und die Schwierigkeiten der Entfernung der Giftreste durch die Wahl von gereinigten Tariergranaten als Unterlage an Stelle der Seidenfäden und durch genaue Vorschrift für die Bereitung der Suspension und die Trocknung, wodurch eine gleichmäßig dünne Schicht trockener Keime erzielt wird. Durch Aufbewahrung bei sehr tiefer Temperatur wird auch die Haltbarkeit angetrockneter Staphylokokken erreicht. Die Exposition gestaltet sich hier wie bei allen Trockenmethoden leicht und auch die Beseitigung von Giftresten ist durch Spülung, eine Entgiftung durch Eintauchen in entsprechende Lösungen mit darauffolgender neuer Spülung unschwer möglich. Bedenklich erscheint dabei nur die Gefahr einer starken und vielleicht je nach Art der Flüssigkeiten ungleichmäßigen Loslösung von Keimen (*v. Baumgarten*). Die Unentbehrlichkeit der angegebenen Spülungen wurde von *Reymann* und *Nyman* dargetan, die sie auch als unschädlich bezeichnen. Die Keime werden dann durch Schütteln abgelöst und in succulentem Agar der Kultur und der Zählung Überlebender zugeführt. *Paul*, der als erster die Relativität der Desinfektionswirkung zu den angebotenen Versuchsbedingungen betont, legt keinen Wert auf die Fortführung des Versuches bis zur Abtötung auch der resistantesten Einzelindividuen, er schließt vielmehr auf den Desinfektionswert des Mittels nach einer durch *Madsen* und *Nyman* aufgetragenen Rechenmethode aus den abnehmenden Keimzahlen zeitlich aufeinanderfolgender Beobachtungen. Schon *Geppert*⁴ hat die Erscheinung der allmählichen, nicht plötzlichen Keimzahlverminderung unter dem Einfluß verschiedener Schädigungen beobachtet und richtig als den Ausdruck einer abgestuften Resistenz der Keime gedeutet. Faßt man die Häufigkeitsverteilung verschiedener Resistenzwerte in einer sonst gleichartigen Keimmenge als Streuung eines rein zufälligen Ereignisses nach dem Fehlergesetze auf, so folgt, daß gleich hohe Resistenzen nur in einer annähernd gleichzahligen Keimmenge zu erwarten sind. *Kroenig* und *Paul*² wiederholen dieser Vorstellung gemäß auch die schon früher durch *Pane*, *v. Behring*³ und *Geppert*⁴ vertretene Forderung nach gleicher Ausgangskeimzahl jedes Desinfektionsversuches, der mit anderen solchen verglichen werden soll. Das Maximum der Resistenz einer Keimart gegen ein Mittel ist aber doch ein ganz bestimmtes, wenn auch ein schwer bestimmbares, und nicht ein mit der Zahl untersuchter Individuen unbeschränkt dehnbares. Daß sich die Dinge tatsächlich so ver-

halten, haben *Gegenbauer* und *Reichel* (S. 64) für die HCl-Resistenz der Milzbrandsporen nachgewiesen. Die Häufigkeit maximal resistenter Keime in der Gesamtzahl ist immer gering, so daß erst von einer gewissen Minimalkeimzahl an die Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit solcher zur praktischen Gewißheit wird. Die Erreichung oder Überschreitung jener Minimalkeimzahl muß also gefordert werden. Auf diese Formel ist auch die oben genannte *Schüdersche* Forderung zu reduzieren.

Auf dem internationalen Hygienekongreß in Berlin 1907 hat *Proskauer* über die Fragen der einheitlichen Wertbestimmung der Desinfektionsmittel zusammenfassend referiert, wobei er sich zum Teil auch auf neue Untersuchungen seiner Schüler *Schneider* und *Seligmann* (1908) stützen konnte. Diese Autoren greifen auf die grundsätzlichen Forderungen *Grubers*³ zurück und anerkennen demgemäß die Überlegenheit der Suspensionsmethodik gegenüber den Trockenmethoden; sie halten jedoch die Anwendung der letzteren, u. zw. in der Form der Sporenfadennethode, bei solchen Desinfektionsmitteln für angezeigt, deren Entfernung oder Neutralisation in Flüssigkeiten auf Schwierigkeiten stößt. Sie betonen die Wichtigkeit der Kontrollversuche für jedesmalige Festlegung der Resistenz des Testmaterials gegenüber bekannten, der zu prüfenden wesensverwandten Schädlichkeiten und die Notwendigkeit der jedesmaligen Kontrolle der zur Vor- und Nachkultur verwendeten Nährböden durch Prüfung der Wachstumsgeschwindigkeit normaler und abgeschwächter Keime, fassen die grundsätzlich an Neutralisationsmethoden zu stellenden Anforderungen zusammen und verlangen die Verwendung fester und flüssiger Nährböden nebeneinander. Der Standpunkt dieser Autoren, der durch *Schneider* (1909) nochmals präzisiert wurde, läßt sich kurz dahin kennzeichnen, daß eine volle Einheitlichkeit der Methodik bei der Wertbestimmung der Desinfektionsmittel angesichts der verschiedenen Zwecke und Umstände nicht zu erreichen sei und in jedem einzelnen Falle durch tunliche Annäherung an die grundsätzlichen Forderungen, sowie durch genaueste Beschreibung des jeweils eingehaltenen Vorganges ersetzt werden müsse.

In England wurde im Jahre 1903 von *Rideal* und *Walker* ein Verfahren als Standardmethode für die vergleichende Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln der Phenolderivatgruppe erfolgreich eingeführt, das als „Carbolsäurekoeffizienten“ das Verhältnis der Konzentration des geprüften Mittels zu der des Phenols bei gleicher Dauer der eben zureichenden Einwirkung definiert. Das Verfahren, von *Rideal* auch auf dem Berliner Kongreß 1907 vertreten, greift auf die Exposition von Bouillonkulturen zurück, von denen allerdings nur Tropfen verwendet werden. Doch muß eine störende Schutzwirkung der Nährstoffe auch schon von ganz geringen Mengen erwartet werden; auch wird so die Zahl der im Einzelversuche verwendeten Keime unzulässig gering und die Art der Abmessung erscheint für exakte Versuche überhaupt als zu ungenau, wozu noch kommt, daß jener Koeffizient auch bei gleichem Desinfektionsmittel und Testmaterial je nach der gewählten Zeitdauer verschieden ausfallen muß. Die Expositionszeiten gehen in Schritten von $2\frac{1}{2}'$ bis zu $15'$; von jedem der verglichenen Mittel werden 2—3 Verdünnungen untersucht. Die Methode wurde trotz ihrer Mängel durch den Bericht der zu ihrer Prüfung eingesetzten Kommission (*Firth* und *Macfadyen*) gebilligt und ausdrücklich als den Methoden *Kochs* und *Pauls* überlegen erklärt, welches Urteil sich nur aus den allgemeinen Vorteilen einer Suspensions- gegenüber den Trockenmethoden verstehen läßt. Das Verfahren ist in England und Amerika sowie in mehreren englischen Kolonialländern antilich eingeführt und stark in Übung. Die ältere englische Literatur über das Verfahren und seine Modifikationen, besonders durch Zuschläge, die in Nachahmung praktischer Schwierigkeiten die Wirksamkeit der Mittel beeinträchtigen, ist bei *Chick* und *Martin*¹ zu finden, die ihrerseits den Vergleich der Konzentrationen für eine bestimmte Zeit (30 Minuten) fordern. Auch *Delépine* (1908), *Hewlett* (1909) sowie *Woodhead*, *Ponder* und *Walker* (1909) geben eine Geschichte der Standardmethoden, die sie zum Teil noch tief in die vorbakteriologische Zeit hinauf verfolgen. Die letztgenannten Autoren

haben zusammen mit *Vesey* und *Purvis* (diese als chemische Referenten) im Auftrage des *Lancet* eine umfassende kritische und experimentelle Untersuchung der ganzen Frage geliefert; sie entwickeln als Ergebnis die sog. *Lancet-Methode*, die sich von der *Rideal-Walkerschen* nur durch Prüfung bei zahlreicheren Beobachtungszeiten — bis 30 Minuten — und Verdünnungen — 10 bis 12 —, durch den Ersatz der Typhustestkeime durch *Bacterium coli*, durch die Überimpfung etwas größerer und genauer gemessener Mengen und endlich durch eine kleine Abweichung in der Berechnung des Koeffizienten — Mittelung der beiden für $2\frac{1}{2}$ und für 30' gefundenen Zahlen — unterscheidet. *Anderson* und *Mc. Clintic* (1911) bemängeln hieran, daß keine bestimmten Verdünnungen festgesetzt sind, so daß das Resultat von den der Willkür unterliegenden Verdünnungsintervallen abhängt, ferner die besondere Hilfsapparate erfordernde Umständlichkeit, die zu lange Zeit von 30 Minuten und das *Bacterium coli* als Testkeim, wegen seiner großen Variabilität. Sie greifen bei ihrer „Hygiene Laboratory“-Methode wieder auf *Bacterium typhi* als Testkeim zurück, verlangen Temperaturregulierung und Abmessung der Kultur mit der Pipette — 0.1 cm^3 Kultur zu 50 cm^3 Desinfektionsmittel — und überimpfen mit genauen Ösen. Die Berechnung erfolgt ganz wie bei der *Lancet-methode*, aber als Mittel des $2\frac{1}{2}$ - und des 15-Minuten-Wertes. *Kendall* und *Edwards* (1911) wollen die *Rideal-Walker-Methode* dadurch verbessern, daß sie warmen Agar mit Suspension von *Bacterium coli* mengen, nach Erstarren in Zylinder schneiden und diese exponieren. Wie zu erwarten, erweisen sich die Keime im Innern der Zylinder auch nach sehr langer Zeit noch als lebendig. Es handelt sich hier um eine angewandte Methode in unzuverlässiger Form. Die Stellungnahme *Phelps* (1911) zur Standardisierungsfrage schließt sich an *Madsen* und *Nymann* und *H. Chick* an, bringt aber neben Unklarem auch manchen Fortschritt; sie wird im nächsten Abschnitte noch zu erörtern sein. Endlich haben *Faustus* und *Florence Rumry* (1920) die Notwendigkeit der Änderung des Standardisierungsverfahrens wieder betont.

In Deutschland hat zuletzt *Hailer*³ (1920) die Fragen der Prüfungsmethoden phenolartiger Desinfektionsmittel grundsätzlich behandelt. Er empfiehlt die Batistmethode und glaubt, wohl zu Unrecht, die Suspensionsmethode ganz ablehnen zu sollen, weil sie bei teeröhlhaltigen Mitteln der Entfernung hemmender Reste größere Schwierigkeiten macht. *Norden* (1921) referiert über die englische Methoden und verlangt Analoges für Deutschland.

Der Hauptmangel der oben dargelegten, in Deutschland üblichen Prüfungsmethoden ist zweifellos das Fehlen einer einfachen rechnerischen Verwertung des Ergebnisses, auf deren Besitz andererseits der praktische Erfolg der englischen Methode offenbar zum guten Teile beruht. Wenn auch eine Zahl wie der Carbol-säurekoeffizient *Rideal-Walkers* ein Mittel nur mangelhaft charakterisiert, so ist er doch verständlich definiert und leicht gewinnbar. Natürlich könnten ähnlich einfache Verhältniszahlen auch mit besserer Methodik und dann auch zuverlässiger gewonnen werden. Das Hauptbedenken gegen sie bleibt ihre Inkonstanz für verschiedene Dauer der verglichenen Desinfektionswirkungen: ein Mittel, das bei kurzfristiger Anwendung doppelt so stark als ein anderes erscheint, d. h. schon in halber Konzentration das gleiche leistet, kann recht wohl bei langfristiger Wirkung auch nur halb so stark erscheinen, d. h. erst in doppelter Konzentration dasselbe leisten. Durch den Vorschlag von *Chick* und *Martin*¹ wird zwar die ungleiche Bewertung gleicher Mittel ausgeschaltet, die einheitliche Bewertung ist jedoch eine ganz willkürliche, weil ja nicht für jede Desinfektionswirkung gerade eine halbe Stunde zur Verfügung steht oder erforderlich ist. Auch die Mittelung der für verschiedene Dauer gewonnenen Zahlen ist nicht angängig, weil diese unter Umständen voneinander sehr stark abweichen können.

Die Methoden der Berechnung der Ergebnisse von Desinfektionsversuchen sollen erst im dritten Kapitel ausführliche Erörterung finden.

b) Beschreibung der Methoden.

Das Testmaterial.

Das Testmaterial für exakte Versuche sind Reinkulturen bekannter Keimarten. Die Wahl der Arten hängt von dem Zwecke der Versuche ab. Genau genommen müßte jede Keimart, die getroffen werden soll, auch für sich geprüft werden, weil die Widerstandskraft einer Keimart gegen ein Mittel nichts über dieselbe Eigenschaft anderer Keimarten gegen dieses Mittel beweist.

Selektive, bevorzugte Wirksamkeit bestimmter Mittel gegen bestimmte Keime ist sehr vielfach beschrieben (s. *Graßberger*¹, S. 65). Zusammenfassende Darstellungen über die Widerstandsfähigkeit der wichtigsten Keimarten gegen die wichtigsten Mittel finden sich in der älteren Literatur bei *Koch*¹, *Maschek*, *v. Behring*^{2, 3} und *Ottolenghi*¹, dann in den Handbüchern bei *Burri*, *Gottschlich*, *Graßberger*¹ und *Croner*², für die Wirkung feuchter Hitze bei *Patzschke*.

Immerhin lassen sich Gruppen von Arten erkennen, die ähnliches Verhalten gegen Schädigungen aufweisen, wenngleich auch hier noch beachtenswerte Unterschiede vorzuliegen scheinen (*Bechold*^{3, 5}). Als Repräsentant solcher Gruppen kann dann mit Vorteil eine wohlcharakterisierte, leicht kultivierbare Art von ansehnlicher Widerstandskraft, deren Vorkommen als zufällige Verunreinigung nicht zu fürchten sein soll (*Koch*¹), gewählt werden, aus deren Verhalten im Versuch sodann Analogieschlüsse auch auf die anderen Angehörigen der Gruppe gezogen werden. Die Heranziehung zahlreicher Arten würde sich oft sehr schwierig gestalten und es besitzen viele wichtige pathogene Keime, wie die Erreger der Pest, Cholera, Ruhr, Influenza, dann Strepto- und Gonokokken gegenüber allen bekannten Mitteln eine so geringe Widerstandskraft oder überhaupt, wenigstens in unseren Kulturen, so geringe Lebenskraft, daß sie sich als Testkeime gar nicht eignen. Beschränkung in der Zahl der geprüften Arten charakterisiert schon seit *Kochs* erster bezüglichlicher Veröffentlichung die ergebnisreichen Desinfektionsarbeiten. Die beiden Hauptresistenzgruppen von Keimen bilden die der sporentragenden und der sporenfreien Keime. Als ihre Vertreter werden zumeist Milzbrandsporen und goldgelbe Staphylokokken für Desinfektionsversuche gewählt.

So verfahren *Koch*, *v. Behring*, *Geppert*, *Gruber* und seine Schule, *v. Esmarch*, *Paul* und seine Mitarbeiter, *Schneider* und *Seligmann* und viele andere. *Rodets* Vermutung, daß Staphylokokken Sporen bilden können, steht vereinzelt da. Bei Strahlungsversuchen wurde durch *Arloing*^{1, 6} und andere eine höhere Resistenz der vegetativen Formen als der Sporen beobachtet, was *Roux* auf eine stärkere Hemmungswirkung belichteter Nährboden für die Sporenauskeimung als für das vegetative Wachstum zurückführt. Nach *Dannappel* bestehen beachtenswerte Resistenzunterschiede der Sporen je nach Ernährungs- und Entwicklungszustand. Nach *Henry-Cernovodeanu* und *Henry* soll die Resistenz mancher sporenfreien Keimarten gegen ultraviolettes Licht überhaupt größer sein als die bestimmter sporentragender Arten.

Anstatt Milzbrandsporen werden auch nicht-pathogene Sporenkeime gewählt, besonders Heu- und Kartoffelbacillen von geprüfter oder auch durch besondere Verfahren regulierter Resistenz (*Weil*², *Hoffmann*³), besonders als Vertreter jener

bei Dampf- und Raumdesinfektionsversuchen. Natürlich muß in solchen Fällen auf die Verhütung von zufälligen Verunreinigungen besonders geachtet werden. Anstatt Staphylokokken wählt man häufig auch *Bacterium typhi*, so beim *Rideal-Walker*-Verfahren, oder *Bacterium coli*, *pyocyaneum* und *prodigiosum*, letzteres besonderes häufig bei Strahlungsversuchen. Aussagen, die für Diphtherie- und Tuberkelbacillen Geltung haben sollen, müssen wegen der abweichenden Resistenzverhältnisse an diesen Keimen selbst erwiesen werden, ebenso solche für Fadenpilze (*Lode, Essinger* u. a. s. bei *Benecke* und *Burri*). Noch mehr gilt das für tierische Mikroben, wie Malariaparasiten, Spirochäten und Trypanosomen, von denen die letztere für exakte Tötungsversuche viele Vorteile bieten. Am allermeisten weichen naturgemäß die Resistenzverhältnisse höherer Organismen: parasitärer Würmer, Insekten u. a. von denen der pflanzlichen Mikroorganismen ab. Auch sie werden häufig in Tötungsversuchen ganz ähnlicher Art wie die Desinfektionsversuche geprüft, für welche auch eine weitgehende Übereinstimmung mit jenen in den grundsätzlichen Erfordernissen sowohl als auch in der Ausführung besteht. Besonders müßte auch dort eine klare Unterscheidung exakter Wirksamkeitsprüfungen und praktischer Erprobungen Platz greifen. Die umfangreiche Literatur des Gegenstandes kann hier nicht beigebracht werden, doch sei auf *Hailers* jüngsterschienene Arbeit² verwiesen.

Es soll niemals bloß ein Stamm einer Art zur Prüfung herangezogen werden, wenn die Ergebnisse für die Art oder gar für die Gruppe Geltung haben sollen. Resistenzunterschiede der Stämme als erblich festgehaltenes Merkmal sind von vorneherein anzunehmen und auch vielfach angegeben.

Solche Befunde bringen: *v. Esmarch*^{1, 3}, *Fraenkel*, *Gruber*³, *Otsuki*¹, *Dannappel*, *Weil*¹, *Ballner*² und *Kokubo*². Manche solcher Angaben müssen aber als unerwiesen und wahrscheinlich übertrieben betrachtet werden, worauf *Kroenig* und *Paul*², *Findel* und *Gegenbauer* und *Reichel* hingewiesen haben. Jedenfalls sind modifikatorische Nährbodeneinflüsse geeignet, erbliche Stammesmerkmale zu verdecken (*Dannappel*, *Schneider* und *Seligmann*, *Kneubühler*). Der Nachweis einer besonders hohen Resistenz eines Stammes gegen ein Mittel beweist auch im allgemeinen noch nichts für sein Verhalten gegenüber einem andern Mittel (*v. Esmarch*, *Heider*).

Bei angewandten Versuchen werden demgegenüber als Testkeime womöglich solche zu dienen haben, die in ihrem natürlichen Vorkommen in ausreichender Häufigkeit sicher anzutreffen sind, wie: *Bacterium coli* in unreinem Wasser, Hausabwässern, Grubeninhalt, Stuhl und Schmutzwäsche; hoch widerstandsfähige und obligat anaerobe Sporen in Erde und Milch, Kokken in der Haut, Milzbrandsporen in Fellen milzbrandiger Tiere, Malariaparasiten im Blut fiebernder Wechselfieberkranker, oder aber auch kultivierte Testkeime von zweckentsprechender Art, wie: *Bacterium coli* oder *typhi* für Wasser-, Milch-, Wäsche-, Gruben-, Hausabwasserdesinfektion; Milzbrand- oder ähnlich widerstandsfähige Sporen für Dampf- und Raum-, Fell- und Gerberei-abwasserdesinfektion; hochresistente und obligat anaerobe Sporen für chirurgische Sterilisation; Staphylokokken für Hautdesinfektion. Eine eigentümliche und für angewandte Versuche nachahmenswerte Anordnung wählt *Rogers* zur Entscheidung der Frage, ob gewisse Desinfektionsmittel genügen, um Fußbodenlehm indischer Häuser von Pestbakterien zu befreien: er behandelt solchen Lehm mit diesen Mitteln,

kultiviert alle Arten überlebender Keime und vergleicht deren Resistenz den geprüften Mitteln gegenüber mit der entsprechenden Resistenz der Pestkeime.

Die Kultivierung der Testkeime, die sog. „Vorkultur“, erfolgt unter solchen Bedingungen, die erfahrungsgemäß das Maximum ihrer Widerstandsfähigkeit erreichen lassen.

Es liegen vielerlei Angaben vor, wie das im einzelnen zu erzielen sei (s. *Graßberger* S. 66). Die Stämme sind nach allgemeinem Urteil lichtgeschützt zu verwahren und zumeist hält man auch dafür, daß Kälte ihre Resistenz am besten erhalte. Doch sollen nach *Chick* und *Martin*¹ Typhusstämmen ihre Phenolresistenz am besten bei fortgesetzter Kultivierung bei 37° bewahren. Auch über besondere, die Resistenz hebende Zusätze zu den Nährböden liegen Feststellungen vor; so wird die Resistenz von Milzbrandsporen am größten, wenn dem Agar Weizen-auszüge zugesetzt werden (*Heider*^{1, 2}, *Reiter*, *Süpfle* und *Dengler*).

Im allgemeinen genügt wohl die Kultur auf der Oberfläche eines unter strenger Einhaltung der üblichen Vorschriften hergestellten Agarnährbodens bei 37°. Nach den Untersuchungen von *Schneider* und *Seligmann* erscheinen allerdings neben dem Gehalt an bekannten Nährstoffen auch unbeherrschbare Unterschiede der Fleischauszüge so sehr bedeutungsvoll, daß die Kontrolle jeder einzelnen Nährbodenpartie auf ihre Tauglichkeit zur Kultivierung der Testkeime erforderlich wird. Eine Erhöhung der spezifischen Giftresistenz eines Stammes gegen ein Mittel gelingt in vielen Fällen durch Gewöhnung an kleine, eben noch nicht entwicklungshemmende Dosen des Mittels (*Kosiaikoff*, *Regenstein*). Ob hier eine Modifikation der Resistenz oder eine Selektion der resistentesten Varianten vorliegt, wäre noch festzustellen.

Üppiges Wachstum und deutliche Entwicklung der charakteristischen Eigenschaften, wie Farbe, Geruch, Konsistenz ist für Testkeime unbedingt zu verlangen. Das Wachstum kann meist durch Schräglagen der Kulturröhrchen infolge der gleichmäßigeren Befeuchtung der Nährbödenoberfläche begünstigt werden: Staphylokokken wachsen aber besser auf trockener Agarfläche (*Schneider* und *Seligmann*). Die Dauer der Kultivierung ist nach den Arten verschieden zu wählen: Sporenkeime werden zumeist nach 2—5, raschwachsende sporenfreie Bakterien nach 1—2 Tagen verwendet. Die Keime werden in sterilem destillierten Wasser sorgfältig abgeschwemmt. Physiologische Kochsalzlösung, die *Czaplewski* empfiehlt, würde die meisten Desinfektionswirkungen stören: osmotische Schädigungen sind, wenigstens bei pflanzlichen Mikroorganismen, durch Wasser nicht zu fürchten. Die Aufschwemmung geschieht bei flachen Kulturschalen durch Verreiben mit dem Platin- oder Glasspatel oder auch in einer sterilen Porzellan- oder Achatreibschale mit dem Pistill, bei Kulturröhrchen durch energisches Schütteln, in allen Fällen zunächst mit kleinen Wassermengen, die dann erst als gleichmäßiger Brei durch weitere Zufügung von Wasser auf das gewünschte Volumen — meist 5, auch 10 cm³ für ein Kulturröhrchen — gebracht werden. Alle solchen Suspensionen müssen durch Papier, Watte,

Leinen oder Glaswolle — *Paul, Bierstein* und *Reuß*² schreiben Filter Nr. 595 von *Schleicher* und *Schüll* in Düren, Rheinland vor — filtriert werden, um eine gleichmäßige Verteilung der Keime zu sichern.

Je nachdem nun die so gewonnene Suspension als solche oder an festen Objekten in dünner Schicht zur Antrocknung gebracht verwendet wird, unterscheidet man Suspensions- und Trockenmethoden. Eine Mittelstellung nimmt die bei Strahlungsversuchen häufige, zuerst von *Pansini* 1889 verwendete, auch bei Exposition gegenüber Gasen, z. B. bei *Ransome* und *Foulerton* gebrauchte frischbesäte Kulturoberfläche ein. Ihre Beschickung muß, um die Gleichmäßigkeit der Exposition tunlich zu sichern, mit filtrierten Keimsuspensionen anstatt mit verstrichenen Keimmassen erfolgen.

Über das Testmaterial der Suspensionsmethode ist nichts hinzuzufügen, als daß die Suspensionen immer frisch bereit sein müssen, weil fast alle Keime auch bei bloßer Gegenwart von Wasser ihren Zustand verhältnismäßig schnell verändern (*Ficker*¹, *Bürgers*, *Schermann* und *Schreiber*).

Als Trockenunterlagen wurden die folgenden gewählt: Seidenfäden von *Koch*¹ u. v. a., Leinwand durch *v. Riegler*, Schumburg u. a., Batist durch *Hailer*³, Filterpapier durch *Ohlmüller*¹ und *Patzschke*, Gelatineplättchen durch *Wallicek*, Gips und Porzellan durch *Ransome* und *Foulerton*, Glas durch *Butersack*, *Öhmichen*, *Spirig*, *Bie*¹ und *Schöller* und *Schraut*, Watte durch *Hill* und *Johnston*, Gummi durch *Johnston*, Horn durch *Lubénau*, Kieselgur durch *Breslauer* und Granaten durch *Kroenig* und *Paul*^{1, 2}. Weiter verbreitete Anwendung haben nur Seidenfäden, Leinwand, Glas und Granaten gefunden. Naturgemäß eignet sich nicht jedes Material für jeden Zweck gleichmäßig, worauf schon im allgemeinen Abschnitte hingewiesen wurde. So kann die Verwendung von Seidenfäden bei Strahlungsversuchen (*Pfeiffer* und *Friedberger*, *Hoffmann*¹) kaum als zweckmäßig gelten. Von Glas dürfen nur chemisch indifferente Sorten verwendet werden, da andere die Resistenz der Keime beeinflussen würden (*Ficker*¹, *Bitter*²); Kieselgur wurde nur für die Exposition gegenüber öligen Flüssigkeiten und Emulsionen empfohlen, Horn nur für angewandte Versuche zur Beurteilung der Tiefenwirkung, weil die Suspension hier in feine Poren eingesaugt wird. Zu gleichem Zweck wurde auch vorgeschlagen (*Börner*), Seidenfäden in Glascapillaren unterzubringen und diese in sternförmiger Anordnung der Dampf- und Raumesinfektionsprüfung auszusetzen, um Tiefe und Richtung der Eindringungskraft zu messen.

Als beste Trocknungsunterlage bezüglich Indifferenz und gleichmäßiger Dicke der Trockenschicht sind die von *Kroenig* und *Paul*^{1, 2}, *Paul*¹, *Paul, Bierstein* u. *Reuß*² empfohlenen, durch zweimaliges Kochen in Salzsäure, Spülung durch Wasser, Alkohol, Äther und wieder durch Alkohol und Wasser gereinigten, trockensterilisierten böhmischen Granatkrystalle, sog. Tariergranaten, von 1.4—2.6 mm Durchmesser

ziemlich allgemein anerkannt worden. Anfängliche Widersprüche (*Otsuki*²) erklären sich durch abweichende Reinigungsmethoden. Trotzdem finden auch noch Seidenfäden und analoge Faserstoffe mit Recht Verwendung und Empfehlung (*Proskauer*, *Schneider* und *Seligmann*, *Hailer*³), weil die dagegen erhobenen Einwände ja keineswegs für alle Arten von Desinfektionsmitteln zutreffen und weil die Herstellung solcher Testobjekte aus Faserstoffen und die Gebahrung mit ihnen gegenüber der Granatmethode größere Bequemlichkeit und für manche Fälle auch andere Vorteile bietet. Wenn die Exposition der Keime in gasförmigen Phasen geschehen soll, also bei Dampf- und Raumdesinfektionsprüfungen, kann die Unterlage im Zusammenhange mit ihren hygroskopischen Eigenschaften von solchem Einflusse auf das Zustandekommen der Wirkung selbst sein, daß die Heranziehung infizierter Faserstoffe auch in den exaktesten Versuchsanordnungen nötig erscheint. Bei Faserstoffen muß ebenfalls auf deren Reinheit und Reinigung vor Antrocknung der Keime strengstens geachtet werden. Seide ist insbesondere oft mit Bleisalzen beschwert, die natürlich störend wirken würden. Ein Gehalt an wasserlöslichen Salzen würde es bei Dampfeinwirkung auf den Faden zu abweichenden Temperaturen kommen lassen (*Eijkmann*¹). Unzulässig erscheint es für exakte Versuche, der anzutrocknenden Suspension Schutzstoffe wie Serum (*Schneider* und *Seligmann*) zuzusetzen. Die Einschaltung einer solchen Erschwerung der Wirkung könnte höchstens bei angewandten Versuchen Platz greifen.

In allen Fällen ist auch die Wirkung der Trocknung selbst auf die Resistenz zu beachten (*Ficker*², *Sitsen*) und es dürfen selbstverständlich nur gleichmäßige Suspensionen, nicht ganze Kulturmassen in natürlicher Lagerung (*Hill*) angetrocknet werden. Die Antrocknung darf auch nicht in zu dichter Schicht und nicht bei höherer Temperatur erfolgen. Die Seidenfäden müssen die Suspension gerade völlig aufsaugen und sich dabei voll benetzen. Die Trocknung erfolgt bei Zimmertemperatur im Chlорcalcium- (*Paul*¹) oder Vakuum- (*B. Hammer*) Exsiccator. Über Schwefelsäure, wie *Schneider* und *Seligmann* verlangen, würde, solange die Objekte noch feucht sind, von ihnen Säure durch die Luft aufgenommen; solche Spuren bewirken schon wesentliche Resistenzverminderungen wenigstens nach längerer Zeit; ebenso würde das Trocknen bei 37° wie es die gleichen Autoren empfehlen, die meisten Keime schwächen. *Pauls*¹ Vorschrift läßt die Granaten, u. zw. 60 Stück für ein Kulturröhrchen, mit der etwa hundert Millionen Keime im Kubikzentimeter enthaltenden, filtrierten Suspension im Erlenmeyerkölbchen schütteln und trocknet sie nach Abgießen und Absaugen des Überschusses auf verzinkten Eisendrahtnetzen im CaCl₂-Exsiccator bei 7° im Eisschrank oder Keller binnen 24 Stunden. Die Granaten werden dann zu etwa 500 Stück in Glasröhrchen unter Vermeidung von Erhitzung eingeschmolzen.

Die Konservierung angetrockneter Keime geschieht durch Lichtschutz und Kälte. *Kroenig* und *Paul*² halten noch 7° für ausreichend, betonen jedoch die große Hinfälligkeit getrockneter Staphylokokken. *Paul* und *Prall* empfehlen zur Konservierung der Resistenz dieser die Temperatur der flüssigen Luft oder die von Kohlensäure-Äther-Gemischen, die etwa — 80° ergeben. So tiefe Temperaturen lassen sich jedoch nur in besonderen Kühlkisten halten. *Laubenheimer*¹ findet Eisschranktemperaturen im Verein mit ständiger Trockenhaltung über CaCl_2 als ausreichend. *Schneider* und *Seligmann* empfehlen, die Trocknung nicht bis zu Ende zu treiben, um den natürlichen Zustand der Keime zu erhalten, womit aber die Haltbarkeit von Trockentestmaterialien überhaupt wesentlich vermindert und die Loslösung der Keime während der Exposition gegenüber Dampf und Flüssigkeiten gefördert würde.

Die Feststellung der verwendeten Keimzahl geschieht so, daß bei Suspensionsmethoden eine gemessene Menge der Suspension, bei Trockenmethoden die durch Schütteln der Granaten oder Zerzupfen des Faserstoffes wieder in Wasser suspensierten Keime in Nähragar von 42° verteilt werden, der dann rasch zur Erstarrung zu bringen, zu bebrüten und bis zum dritten Tage auszuzählen ist. Ob dann diese Zahl als genügend groß betrachtet werden darf, ist nur durch die Erfahrung zu entscheiden, daß die zu beobachtende Resistenz auch durch eine Vervielfachung der Zahl nicht mehr zu steigern ist. *Gruber*³ verlangt primäre Überimpfungskeimzahlen von mehreren Millionen, so daß die von diesem Autor vorgeschlagene Sekundärkultur kaum mehr als tausend Keime enthält. Bei der Methode *Pauls*¹ und *Laubenheimers*¹ ergeben sich Überimpfungskeimzahlen von 10—60.000 Keimen.

Die Exposition.

Die Exposition des Testmaterials gegenüber dem desinfizierenden Einflusse muß sich so vollziehen, daß ein wohldefinierter Zustand rasch erreicht und nach gemessener Zeit auch wieder rasch aufgehoben werden kann; die Temperatur während der Einwirkungsdauer muß konstant und bekannt sein, belangreiche Nebenumstände müssen ausgeschaltet oder durch planmäßige Variation studiert werden.

Die Exposition ganzer Kulturrasen erscheint im allgemeinen wegen der damit fast immer verbundenen Ungleichmäßigkeit und meist auch wegen störender Wirkungen der Nährbodenmasse als unzulässig. Nur bei Versuchen mit hohen Drucken und in angewandten Versuchen über die Unschädlichmachung von Laboratorienkulturen oder über die Brauchbarkeit eines Gases für die Sauerstoffverdrängung bei anaerober Kultur könnte so vorgegangen werden. *Löfflers* mit solcher Methodik angestellte Versuche über die Wirkung der Gurgelwässer gegen Diphtheriebakterien beweisen deshalb wenig und bilden ein Beispiel ange-

wandter Versuche mit verfehlter Anordnung. Noch schlimmer erscheint es aber, wenn eine solche Anordnung bei sonst exakten Versuchen, die die reine Wirksamkeit von Mitteln prüfen wollen, verwendet und empfohlen wird (*Bechold* und *Ehrlich*, *Bechold*^{3, 5}). Die Exposition von Kulturrasen wurde auch gegenüber aktinischen Schädigungen wiederholt angewendet (*Pansini*, *Roth* und *Aufrecht*, *Pfeiffer* und *Friedberger*), wo sie kaum besser am Platze erscheint als in Gasen und Dämpfen, worauf *Duclaux* schon 1889, bei Referierung der Arbeit *Pansinis* hinweist.

Für die Exposition in gasförmigen Phasen kommen nur Trockentestobjekte in Betracht. Hier ist die Sicherstellung bestimmter Konzentrationen, d. h. Partiär- und Dampfdrucke, sowie Temperaturen schwieriger als in Flüssigkeiten.

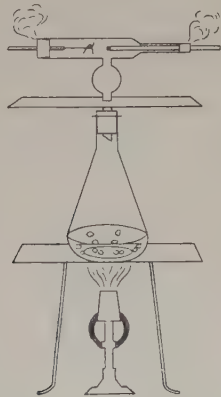
Bei der Prüfung der Heißluftwirkung sind neben den Verhältnissen der Lufttemperatur und der Luftfeuchtigkeit immer auch die der Wärmestrahlung und bei angewandten Versuchen noch die der Wärmepenetration aufs genaueste zu beachten. *Koch* und *Wolffhügel* exponieren in geräumigen, geheizten Apparaten bei 3% Luftfeuchtigkeit. *Schumburg*, *Ballner*³ und *Xylander* exponieren in besonders konstruierten doppelwandigen Schränken, in denen die Feuchtigkeit durch Tropf- und andere Vorrichtungen variiert und reguliert wird. Dies kann auch nach *Bartsch* für bestimmte relative Feuchtigkeiten durch Hineinstellen offener Gefäße mit bestimmt konzentrierten CaCl_2 -Lösungen bewirkt werden. *Schumburg* prüfte auch den Einfluß der Bewegung der Luft durch Exposition in einer Kaffeerösttrommel. Geschieht die Exposition bei angewandten Versuchen in der Tiefe von Objekten, so muß der dort zu beobachtende Gang der Temperatur durch physikalische Untersuchungen genau festgestellt werden. Solche für die Beurteilung des praktischen Wertes dieser Desinfektionsverfahren äußerst wichtige Untersuchungen finden sich bei den oben genannten Autoren, sowie besonders auch in Arbeiten *Rubners*^{1, 2, 4} genau beschrieben (s. auch *Graßberger*¹ S. 24—29).

Die Exposition gegenüber D ä m p f e n kann entweder in gasdicht geschlossenen Räumen, bei Gleichgewichtszuständen oder in offenen Gefäßen bei Strömungszustand im überschüssig produzierten Dampf stattfinden. Wenn es gelingt Überhitzungen zu vermeiden, so ist durch die Spannung der Dämpfe zugleich die Temperatur festgelegt, die sich bei strömenden Dämpfen auf die des Siedepunktes einstellt. Bei den praktisch wichtigsten Wasserdämpfen kann die Exposition im oben beschriebenen Autoklaven und in überhitzungsfrei konstruierten Dampföpfen selbst geschehen, sie geschieht aber für strömenden Dampf am besten in dem von *Ohlmüller*² (S. 238) zuerst angegebenen Apparat mit den von *Hoffmann*³ oder den von *Graßberger*¹ (S. 82) angegebenen Verbesserungen. Letzterer empfiehlt, den Apparat in seiner alten Form durch zwei Asbestplatten gegen Strahlungswirkungen der Kochflammen

zu schützen und die rasche Luftaustreibung aus dem oberen Glasansatze, in dem das Testmaterial exponiert wird, durch Anbringung von Ausströmöffnungen an beiden Verschlusßkorken zu bewirken (Fig. 131). Dem Siedeverzug muß durch Eintragung sorgfältig gereinigten Bimssteines oder spitzer Platingeräte vorgebeugt werden.

Eine systematische Variation der Dampftemperatur ist grundsätzlich nur durch Druckveränderungen möglich, während mit der Verschiebung der Siedetemperatur durch nicht flüchtige Lösungsmittel, besonders Salze, zwar auch die Dampftemperatur verschoben wird, jedoch in einem heute noch nicht ausreichend bekannten und aufgeklärten Maße. Den Stand dieser physikalischen, für die Desinfektionslehre wichtigen Frage referiert *Graßberger*¹ (S. 42) ausführlich. In geschlossenen Räumen, wo es zu Gleichgewichtszuständen kommt, ist die

Fig. 131.



Dampfphase über Salzlösungen für Wasser ungesättigt, was bei der Heißluftwirkung zur Regelung der Sättigung verwendet werden kann (*Bartsch*). Ein Salzgehalt der Testobjekte verursacht wie erwähnt Irrtümer, u. zw. weil sich die die Keime treffende Temperatur dann auf den höheren Siedepunkt der dort entstehenden Salzlösung einstellt (*Eijkmann*¹).

Von Wichtigkeit ist, daß der Keimgehalt der Testobjekte nicht durch nebensächliche Wirkungen der Exposition vermindert werde. Besonders liegt bei harter, nicht hygroskopischer Unterlage die Gefahr der Bildung und des Abfließens von Flüssigkeitstropfen durch Kondensation der Dämpfe auf der glatten Oberfläche vor, wodurch es zu starken Keimverlusten kommen kann. Eine Verwärmung würde jedoch die Expositionsbedingungen verschieben, weil dann schon die Wärme allein auf die Keime einwirkt. Es sind deshalb für solche Fälle, wo Kondensation zu erwarten ist, also bei allen Versuchen mit gesättigten Dampfphasen, Faserstoffe als Unterlage vorzuziehen, die allerdings wieder bei

scharfer Trocknung die Gefahr einer Überhitzung durch hygroskopische Kondensation mit sich bringen (*Vogel, Rubner², Graßberger* S. 50), die jedoch zu vermeiden ist, wenn die Objekte kurze Zeit vor der Exposition in feuchte Luft gebracht werden.

Auch bei der Exposition gegenüber Dampf ist es für praktische Desinfektionsfragen äußerst belangreich, wie in der Tiefe von Objekten gelegene Keime von den desinfizierenden Bedingungen Dampfdruck und Temperatur getroffen werden. Die wichtigsten auch auf diese physikalischen Fragen gerichteten Untersuchungen sind die von *Koch, Gaffky* und *Löffler, Sambuc, v. Esmarch¹, Wolffhügel, Gruber^{1, 2}, Teuscher, Frosch* und *Clarenbach, Budde* und besonders die von *Rubner^{1—5}*; ein ausführliches Referat dieser und anderer einschlägigen Arbeiten findet sich bei *Graßberger¹* (S. 46—54). Für die Prüfung der Wirkung der unter 100° gesättigten Wasserdämpfe bei erniedrigtem Druck sind besondere Versuchsanordnungen mit Luftabsaugapparaten erforderlich. Beschreibungen solcher Versuchsanordnungen und die Aufklärung der besonderen physikalischen Verhältnisse finden sich bei *Schut, Ballner¹, Rubner⁵*.

Die Exposition des Testmaterials gegenüber Formaldehyddämpfen nähert sich meist den eigenartigen Verhältnissen der praktischen Raumdesinfektion. Zur Prüfung der Wirksamkeit solcher Verfahren wird nach *Flügges* Vorgang das auf Faserstoffen angetrocknete Testmaterial an mehreren als typisch gewählten Punkten eines abgedichteten Zimmers den zu entwickelnden Dämpfen offen ausgesetzt. Über die bei der Prüfungstechnik zu beobachtenden Verhältnisse der Temperatur und Luftfeuchtigkeit, die sowohl für das Zustandekommen von Polymerisationen als auch für die Wirkungsintensität des Mittels selbst von größter Bedeutung sind, ist von *Flügge*, dann von *Rubner* und *Peerenboom, Mayer* und *Wolpert^{1, 2}, Reichenbach¹* u. a. wichtiges veröffentlicht worden. Zahlreiche Nachprüfungen wollten die Prüfungsmethodik noch weitergehend den praktischen Verhältnissen anpassen, wodurch jedoch die reine Wirksamkeit aller geprüften Mittel immer schwerer beurteilbar wird. Bei Prüfung neuer Verfahrensweisen sollten, wie *Krombholz¹* verlangt, immer streng vergleichbare Parallelversuche mit dem klassischen Verfahren *Flügges* durchgeführt werden. *Hüne¹* schlägt vor, die Tiefenwirkung durch Exposition von Parallelproben mit steigender Zahl von Papierhüllen zu messen. *Dienes* bringt physikalische Untersuchungen über das Eindringen von Formaldehyddämpfen in poröses Material.

Versuche mit Ammoniakdämpfen bringt *v. Riegler*, solche mit Dämpfen verschiedener flüchtiger Stoffe *Frank¹*; mit Dämpfen des Äthylalkohols arbeiten *v. Brunn, Frank²*, und mit verbesserter Methodik *Seige*, mit Amylalkoholdämpfen *Bocchia*.

Mehr Bedeutung als diese letzteren Versuche mit Dämpfen einzelner flüchtiger Stoffe haben solche gewonnen, die verschiedene Dämpfe

mit Wasserdampf kombinieren; sie haben bis zur Entwicklung des Formaldehyd-Vakuum-Verfahrens geführt. Die Methodik solcher Dampf-kombinationsversuche wurde zuerst durch *Rubners* Schüler *Eug. Mayer* und *v. Esmarchs* Schüler *Kokubo*¹ bearbeitet, dann durch *v. Esmarch*⁴ mit der Einführung künstlichen niedrigen Druckes bereichert. *Herzog*, der die Ergebnisse nachprüft und bestätigt, gibt eine Entwicklungsgeschichte der älteren Versuchsmethodik. *Rubner*⁶ hat sodann nach der physikalischen Seite durch Schaffung klarer Expositionsbedingungen, sowie nach der praktischen Seite durch das Studium der Eindringung diese Methodik wesentlich verbessert, in welcher Form sie dann durch seinen Schüler *Christian* erprobt wurde. Der von letzteren beschriebene Apparat für die Exposition wurde neuerdings durch *Stockvis*, der die Ergebnisse und die alleinige Tauglichkeit des Formaldehyds für solche Dampfkombinationswirkungen bestätigt, in vereinfachter Form verwendet.

Die Exposition gegenüber keimfeindlichen Gasen kann für Trockenobjekte direkt, u. zw. in konstant durchströmten, oder in geschlossenen Gefäßen, bei höheren Drucken in Autoklaven, *Berthelotschen* Bomben u. dgl. auch für Suspensionen, natürlich-keimhaltige Flüssigkeiten, ja in diesem Falle sogar für ganze Kulturmassen in natürlicher Lagerung erfolgen. Beispiele exakter Arbeiten sind die von *Fischer* und *Proskauer* über die Wirkung des Chlors und Broms, die von *Hoffmann*² über Kohlensäure und die von *Foa* und von *Berghaus* über Kohlensäure-, Sauerstoff- und Wasserstoffwirkung, in denen auch die umfangreiche ältere Literatur dieser Gegenstände zu finden ist. In der zuletzt genannten Arbeit ist auch die Frage der hemmenden und tötenden Wirkung des Sauerstoffes auf obligat anaerobe Keime berührt und es wird dort auf die einschlägige Literatur verwiesen. Exakte Versuche über Ozonwirkung bringen *Sonntag*, *Ohlmüller*² und *Ransome* und *Foulerton*. Auch *Paul*, *Bierstein* und *Reuß*¹ bringen Versuche mit Gasen ohne Verwendung höherer Drucke unter Exposition von Granaten in geschlossenen Glasgefäßen.

Eine reine Exposition hohen Drucken gegenüber, die sich nur als wenig keimfeindlich erwiesen hat, erfolgte für Flüssigkeiten, auch für ganze Kulturmassen in entsprechenden Preßzylindern durch *Krause* sowie *Chlopin* und *Tamann*, bei denen auch die ältere Literatur des Gegenstandes zu finden ist.

Die Exposition gegenüber flüssigen Desinfektionsmitteln kann sowohl mit Suspensionen als auch mit Trockentestobjekten vorgenommen werden. Bei ersterer Methodik werden die Keime meist in größerer Zahl und gleichmäßiger Weise von der Wirkung getroffen als bei letzterer, die dagegen in vielen Fällen die Wiederausschaltung der Einwirkung leichter gestattet.

Wo es sich um die reine Wirkung des Wassers bei höheren Temperaturen handelt, wie bei Siede- und Pasteurisierungsversuchen, werden

Trockentestmaterialien wegen der starken Ablösung von Keimen meist vermieden. Bei exakten Pasteurisierungsversuchen (*Forster*^{1, 2}) werden die Suspensionen in zugeschmolzenen Röhrchen unter die Wasserbadoberfläche versenkt, weil sonst Teile der infizierten Glaswand unerwärmt bleiben, wodurch, sowie durch Verkeimung des Unterschiedes reiner und praktischer Versuche viele irrige Angaben über zu hohe Resistenz von Keimen zustande gekommen sind (s. *Graßberger*¹, S. 29 bis 36). Exakte Siederversuche brachten zuerst *Koch*, *Gaffky* und *Löffler*, dann für Temperaturen unter 100° unter Vergleich entsprechender Erwärmungs- und Dampfversuche *Schut* und später *Grimm*. Erwärmungsversuche bei noch niederen Temperaturen bringt *Ficker*¹, der auf den dabei auftretenden Einfluß der Keimdichte hinweist; zuletzt beschreibt *Patzschke* Erwärmungsversuche mit Papiertestobjekten.

Die Eintragung der Testobjekte in desinfizierende Lösungen geschieht durch sorgfältiges Untertauchen bei Vermeidung des Haftens von Luftbläschen, die einen Teil des Objektes gegen die Einwirkung der Lösung schützen würden. Die von *Paul* und seinen Mitarbeitern gegebene Vorschrift verlangt, daß die infizierten Granaten einzeln mittels einer Platinspitzenpipette auf ein in die Lösung getauchtes Platinnetzchen gelegt werden, mit dem sie nach der gewünschten Einwirkungsdauer wieder aus der Lösung gehoben werden.

Suspensionen, die einer chemischen Desinfektionswirkung ausgesetzt werden sollen, dürfen nicht in eine entsprechend konzentrierte Lösung eingebracht werden, sondern es muß umgekehrt die konzentrierte Lösung in die schon vorher unter sorgfältiger Vermeidung einer Infektion der Glaswand in das leere Glasgefäß hineingemessene Suspension zufließen gelassen werden, wobei wieder ein Bespritzen der Wand vermieden werden soll. Würde die Suspension in die Lösung gegeben, so stünde während des Zufließens ein Teil der Testkeime unter der Einwirkung einer höheren als der zu prüfenden Konzentration, weil sich die Lösung erst durch die Zufügung der Suspension auf diesen Gehalt verdünnen würde. Im umgekehrten Falle ist die zu prüfende Konzentration erst mit dem Ende des Zufließens erreicht. Da diese volle Exposition rasch erreicht werden soll, empfiehlt es sich, die Suspension aus einer Ablaufpipette zufließen zu lassen.

Das Mengenverhältnis der zu vereinigenden Suspension und Lösung muß genau festgestellt werden und ein kommensurables sein, letzteres schon, um die Genauigkeit der volumetrischen Messung annähernd gleichzuhalten, aber auch um eine ausreichende Keimzahl zur Exposition zu bringen. Am meisten empfiehlt sich die durch *v. Esmarch*² zuerst vorgeschlagene, auch durch *Gruber*³ empfohlene Gleichheit der Volumina, so daß die Ausgangskonzentration der Lösung immer genau die doppelte der zu prüfenden sein muß. Die Methoden, die mit einem oder auch mit einigen Tropfen der Suspension arbeiten (*Rideal* und *Walker*, *Chick* und *Martin*¹), sind nicht zu billigen, noch

weniger eine „Mikromethode“ (*Reiter* und *Arndt*), die beide Volumina nur mittels Ösen abmißt.

Die Exposition gegenüber sog. oligodynamischen Wirkungen (*Saxl*¹⁻³, *Baumgarten* und *Luger*⁴, *Streck*, *Doerr*), die sich technisch von der sonst in Flüssigkeiten geübten nur durch die stattfindende oder stattgefunden habende Berührung der Flüssigkeit mit blanken Metallen unterscheidet, leidet an dem Übelstande, daß die Konzentration und Natur der wirkenden Stoffe nicht bekannt, und eben nur an der keimfeindlichen Wirkung meßbar ist, so daß solchen Versuchen noch kaum der Charakter exakter Desinfektionsversuche zuerkannt werden kann.

Eine für Hefe keimfeindliche Wirkung glaubt *Holzinger* bei eigenartiger komplizierter Versuchsanordnung für osmotische Diffusionsströmungen im Nährboden feststellen zu können.

Die Gegenwart von Lösungsgenossen verändert im allgemeinen jede Desinfektionswirkung eines Stoffes; sie ist deshalb überall zu vermeiden, wo sie nicht eben in ihrer Wirkung geprüft werden soll, in diesem Falle aber ebenso exakt quantitativ zu verfolgen, wie die Konzentration des desinfizierenden Stoffes.

Vielfach werden absichtlich die Expositionsbedingungen in Flüssigkeiten durch Zusätze modifiziert, die den praktischen Schwierigkeiten mehr oder weniger entsprechen. Am häufigsten und auch am besten entsprechend sind seit *v. Behrings*¹ Vorgang Zusätze von gelöstem Eiweiß, meist in Form von Serum, so bei *Pitzmann* u. v. a. Bedenklicher erscheint der Zuschlag pulverförmiger Stoffe (*Chick* und *Martin*¹), die Adsorptionswirkungen und durch partielle Lösung und Absorption unbekannte Verschiebungen des Lösungsgefüges mit sich bringen. Auf die Bedeutung dieses letzteren für die Desinfektionswirkung wird noch im Kapitel über die Forschungsmethoden eingegangen werden.

Die Kombination der Wirkung mehrerer keimfeindlicher Stoffe in einer Lösung war auch Gegenstand eingehender Untersuchungen, wobei sich meist das Hauptinteresse dem Zusammenwirken von Seifen mit anderen Desinfektionsmitteln zuwandte. In den einschlägigen Arbeiten von *Rasp* und *Frei* wird über die ältere Literatur berichtet (s. auch *Eisenberg* und *Okolska*).

Kompliziert und oft schwer überblickbar gestalten sich die wahren Expositionsverhältnisse bei mehrphasigen Desinfektionsmitteln, wie kreolinartigen Emulsionen wasserunlöslicher Phenolderivate in Vermengung mit Harzen und Kohlenwasserstoffen (*Henle*, *Schneider* und *Seligmann*, *Chick* und *Martin*²), ferner die emulsierten Salben (*Gottstein*, *Breslauer*) und die desinfizierenden Adsorbentien: Pulver (*Eugling*, s. dort die Literatur) und kolloidalen Stoffen (*Bechhold*^{1, 2, 6}, *Halberstätter*). In den meisten solchen Fällen dürften die Keime am richtigsten als in der Phasengrenzschicht befindlich vorzustellen sein.

Auf die Feststellung und konstante Erhaltung der Temperatur während der Exposition ist sorgfältig zu achten, am besten durch Anwendung des *Ostwaldschen*¹ oder ähnlicher Thermostaten. Die Er-

forschung des Einflusses der Temperatur auf die Desinfektionskraft wird im folgenden Kapitel erörtert werden.

Die Exposition gegenüber *aktinischen* Einwirkungen: elektromagnetischen Wellen und Strahlungen aller Art verlangt eine Kenntnis von Wellenlängen und Intensität (Energiedichte der Strahlen), sowie Berücksichtigung der verwickelten Absorptionsverhältnisse und Vermeidung von Nebenwirkungen durch Hitze und photochemische Reaktionen mit Nährstoffen.

Die ersten Versuche von *Downes* und *Blunt* in den Jahren 1877/78 waren noch biologisch sehr unexakt. Diese Autoren exponieren zunächst zufällig verunreinigte Kulturmedien dem Sonnenlicht gegenüber durch lange Zeit und schließen auf Desinfektion und Hemmung aus eintretender oder ausbleibender Trübung nach einer durch Bleipapierschutz erfolgenden Unterbrechung der Bestrahlung. Sie wiederholen solche Versuche mit Farbenfiltergläsern und mit natürlich-keimführendem Wasser, dem nachträglich Nährstoffe zugesetzt werden. Aus dem Umstande, daß die Lichtwirkung bei Luftausschluß vermindert scheint, schließen sie auf eine besondere Vermittlerrolle des Sauerstoffes. *Duclaux*¹ arbeitet 1885 als erster mit Reinkulturen; er exponiert zunächst an Glas getrocknete Milchkulturen nicht-pathogener Keime in der Sonne, später² auch Bouillonkulturen pathogener. Die Verwendung von ganzen Kulturrasen lehnt er ausdrücklich ab. *Arloing*¹ exponiert auch 1885 Milzbrandkulturen in farbloser Hühnerbouillon zuerst in künstlichem Licht, dann²⁻⁴ im Thermostaten dem durch einen Heliostaten regulierten Sonnenlicht gegenüber, in beiden Fällen auch mit Lichtfiltern; er benutzt später zur Exposition ganz flache Gefäße mit 2—3 mm der Schichtdicke der Flüssigkeit und exponiert unter Eiskühlung⁵, um die Lichtwirkung auf Sporen von der auf etwa auskeimende Stäbchen zu trennen. *Roux* exponiert 1887 erhitzte Anthraxkulturen in klarem Humor aqueus des Ochsenauges und heller Kalbsbouillon mit und ohne Gegenwart der Luft, deren großen Einfluß, ebenso wie den der Natur gegenwärtiger Nährstoffe er betont. Er findet zeitlich begrenzte entwicklungshemmende Eigenschaften belichteter Nährböden, u. zw. wirksamer für Sporen als für die vegetativen Formen, wodurch die gelegentliche Erscheinung der Resistenzumkehrung erklärt wird. *Arloing*⁶ erwidert, daß das letztere Phänomen nur auftritt, wenn fehlerhafterweise dichte Kulturen anstatt klarer Aufschwemmungen im Bouillon verwendet werden. *Gaillard* bringt Versuche mit *Arloings* Methodik an verschiedenen Keimarten. *Pansini* exponiert 1889 neben ganzen Kulturen und frisch beimpften Kulturoberflächen auch Bouillonkulturtropfen am Deckglas in der feuchten Kammer von Hohlsliffobjektträgern. Er vermeidet bei letzterer Methodik die Entwicklungshemmung, da er auf unbelichtete Nährböden überimpft. *Janovski* exponiert 1890 frisch mit Typhuskeimen beschickte Bouillon dem diffusen Tageslichte und der Sonne, auch mit Filtern. Um Entwicklungshemmung auszuschließen, überträgt er einerseits einen Teil der im Lichte klargebliebenen Bouillon in ein neues unbelichtetes Röhrchen, beschickt anderseits den Rest mit frischen Typhuskeimen. Aus dem eindeutigen Ausfall beider Proben schließt er auf das Fehlen von Entwicklungshemmung. *Buchner*^{1, 2} exponiert 1892/93 wässrige Suspensionen von *Bacterium coli*, *pyocyaneum*, *Vibrio cholerae* u. a., zum Teil mit Zusatz von Fleischextrakt sowie frischbeschicktem Agar, der mit wässrigen Suspensionen vermischt zur Erstarrung gebracht wird, zum Teil durch dicke Wasserschichten hindurch, sowie endlich natürlich-keimhaltiges Wasser gegenüber Sonnenlicht. *Dieudonné*¹ exponiert 1894 Agar- und Gelatineplatten wie *Buchner* gegen Sonne, zum Teil mit Filtern, und schließt Entwicklungshemmung durch Kontrollversuche mit belichteten Nährböden aus. Er zeigt aber noch im gleichen Jahre², daß in Gelatine und Agarnährböden, ebenso wie in Wasser durch Belichtung bei Luftgegenwart Wasserstoffsuperoxyd entstehen kann, dem er für

das Zustandekommen der Hemmungswirkung und auch der tödenden Wirkung des Lichtes Bedeutung beimißt. *Kruse* exponiert 1895 Tröpfchen wässriger Suspension in feuchter Kammer wie *Pansini* und frischbeimpfte Nährlösungen in der Kuppe von Reagensgläsern. Er findet die Entstehung keimfeindlicher Eigenschaften bei Bouillon größer als bei Wasser und keinesfalls genügend, um die Lichtwirkung auf die Keime zu erklären. Da im Wasser unter Lichteinfluß bei Luftgegenwart mehr H_2O_2 als in Nährlösungen entsteht, glaubt er die Keimfeindlichkeit belichteter Medien nicht auf diesen Stoff zurückführen zu sollen; er denkt an die Entstehung keimfeindlicher Stoffe durch photochemische Reaktionen der Eiweißkörper des Nährbodens. *Roth* und *Aufrecht* prüfen 1900 in unexakter Weise die Wirkung von Phosphoreszenzlicht.

Die nachfolgenden Autoren beschäftigen sich, soweit nicht besonders hervorgehoben, ausschließlich mit der Wirkung der ultravioletten Strahlen auf Keime. *Strebel*¹ exponiert frischbeimpfte Agarflächen unter Quarz 1901, *Bie*, der auch die Methodik der Bestrahlungsdesinfektionsversuche allgemein abhandelt¹, 1905 ebenso², aber auch Glastrockenobjekte und Suspensionen. Die Unwirksamkeit von Röntgenstrahlen gegen Keime stellen *Jastram* 1905 und *Ruß* 1906 fest. Die Arbeiten von *Thiele* und *Wolf*² 1906 und *Wiesner* 1907 bringen Darstellungen der älteren Literatur und der einschlägigen physikalischen Verhältnisse bezüglich Intensitätsverteilung und Absorption sowie zahlreiche Versuche. Die ersteren Autoren exponieren Suspensionen in stark verdünnter Bouillon, die zwecks Ausschaltung der Absorption in beständiger Bewegung gehalten wird, *Wiesner* exponiert frisch mit Suspensionen beimpfte Nähr- und Wasseragarflächen einem nach Tunlichkeit engbegrenzten Abschnitte des Spektrums von elektrischen Bogen- und Quecksilberdampflampen bei gemessener Intensität. *Franz* bringt 1908 angewandte Versuche gegenüber den natürlichen Keimen in krankem Gewebe. *Bordier* und *Horand* (1910), *Glaser* (1911), *Scharf* (1912), *Henry-Cernovodeanu* und *Henry* (1912), *Okker-Bloom*^{1, 2} (1913) und *Voigt* (1916) bringen Versuche mit teils natürlich keimhaltigem, teils mit Suspensionen versetztem Wasser, wobei die drei zuletzt genannten Autoren die Mitwirksamkeit von Ozon und Wasserstoffsuperoxid ausschließen zu können glauben. *Friedberger* bringt 1914 angewandte Versuche mit Exposition von Suspensionen in Blut und Harn, sowie der natürlichen Keime der Mundhöhle. In jüngster Zeit prüft *Miramond de Laroquette* wieder die Wirkung des natürlichen Sonnenlichtes auf Bakterien an Nährbodenoberfläche in trockenem Zustand und in Flüssigkeiten, wobei er den leuchtenden Teil des Spektrums als wirksamer findet als den ultravioletten. Zahlreiche andere auf die Wirkung elektromagnetischer Wellen gegenüber Mikroorganismen bezügliche Arbeiten, die methodologisch geringeres Interesse bieten, finden sich zitiert in den Arbeiten von: *Raum*, *Dieudonné*¹, *Thiele* und *Wolf*², *Wiesner* und *Bujwid*.

Auch andere Strahlungen wurden auf Keimfeindlichkeit geprüft: *Aschkinas* und *Caspari*^{1, 2} sowie *Strebel*² exponieren 1901 frischgeimpfte Agarplatten, tief und oberflächlich besät, gegenüber Bequerelstrahlen; *Danysz*, *Pfeiffer* und *Friedberger* und *Hoffmann*¹ prüfen 1903 die bakteriologische Radiumwirkung, die beiden letzteren Arbeiten mit Exposition frischbeimpfter Agarflächen und Seidenfäden, *Pfeiffer* und *Friedberger* auch von jungbewachsenen Agarflächen. *Dorn*, *Baumann* und *Valentiner* exponieren 1905 ebenfalls frischbeimpfte Agaroberfläche gegenüber Radiumemanation. *Werner* bringt 1905 angewandte Radiumversuche mit Tötungs- und Entgiftungswirkung auf die im Gewebe befindlichen Keime und einer Übertragung der tödenden Wirkung auf das durch die Bestrahlung nekrotisierte Gewebe. *Jansen* exponiert 1910 auch frischgeimpfte Agarplatten gegenüber Radiumemanation und beschreibt genau die Methode der Gewinnung und Messung dieses Stoffes. *Jansen* und *Strandberg* schließen 1912 die Beteiligung von Ozon an der Emanationswirkung aus. *Bondy* bringt 1913 Versuche über Entwicklungshemmung durch Mesothorium. *Arzt* und *Kerl* geben bei angewandten Versuchen über Radiumwirkung auf Trypanosomen in Blut 1913 eine genaue Beschreibung

der Methodik und Dosierung. Auch *Halberstätter* exponiert Trypanosomen-suspensionen, aber in Kochsalzlösung, auch unter Zusatz kolloidaler Metall-lösungen gegenüber Radium-, Mesothorium- und Röntgenstrahlen. *Grober* und *Pauli* untersuchen 1919 die Desinfektionswirkung von Kathodenstrahlen gegen-über angetrockneten Bouillonkulturen. Endlich prüft *Kuznitsky* 1920 die Wirkung von Alphastrahlen des Thorium X allein und im Zusammenwirken mit verschie- denen chemischen Desinfektionsmitteln, leider gegenüber ungeeignetem Test- material: ganzen Kulturen von Gonokokken u. a. meist in Kultur sehr lebens- schwachen Keimen.

Kombinationen von Strahlungswirkungen mit denen von Lösungstoffen bilden die Desinfektionsversuche mit den sog. photodynamischen Stoffen, so bei *Essinger*, *Mittler*, *Huber*, *Jodelbauer* und *Tappeiner* und *Friedberger*, ferner die Versuche *Riegels* über Lichtwirkung auf Wasser mit Citronensäure und die eben genannten *Kuznitskys* mit Alphastrahlen und chemischen Desinfektionsmitteln.

Die Exposition gegenüber elektrischen Strömen muß mit beson- deren Vorsichtsmaßregeln verknüpft werden, die *Spicker* und *Gottstein* noch zum Teil außer Acht ließen, während sie *Krüger*, *Thiele* und *Wolf*¹ sowie *Lehmann* und *Zierler* beschrieben haben. Bei ihrer Ein- haltung ließ sich keine keimtötende Wirkung von Strömen feststellen, die nicht auf ihre elektrolytischen Nebenwirkungen an den Elektroden zurückgeführt werden könnten.

Versuche, die darauf abzielen, die Entwicklungshem- mung zu messen, die von einem Stoffe ausgeht, unterscheiden sich von Desinfektionsversuchen wie erwähnt dadurch, daß die Exposition eine dauernde ist. Sie finden zumeist in einem abgesehen von dem Zusatze des Hemmungsmittels für das Wachstum der Testkeime ge- eigneten Medium statt. Von der verschiedenen Zusammensetzung dieses Nährmediums hängt die zur dauernden Entwicklungshemmung eben zureichende Konzentration: der Hemmungswert, naturgemäß stark ab, was in fast allen Arbeiten über Entwicklungshemmung, z. B. bei *v. Behring*³ betont wird. *Iwanoff* hat für Schimmelpilze diesem Einflusse besondere Untersuchungen gewidmet. *Stevens* versuchte Hemmungswerte in Wasser zu beobachten, wobei aber nur die ersten Teilungen, die noch auf Kosten der Reservestoffe stattfinden, beobachtet werden können. Da nicht alle Arten Keime in Wasser überhaupt Teilungen eingehen, erscheint die Methode nur begrenzt anwendbar. Wie *Clark* gezeigt hat, liegt oft für die eine Mikrobenart der Hemmungswert höher, der Tötungswert des gleichen Mittels aber tiefer als für die andere und umgekehrt; aber auch je nach der Art der Mittel, liegen beide Werte sehr verschieden weit auseinander.

Vermeidung der Entwicklungshemmung.

Bei allen Desinfektionsversuchen ist es wie erwähnt nötig, die den Testkeimen und -materialien nach der Exposition anhaftenden Reste des Desinfektionsmittels so vollständig und rasch zu beseitigen, daß nicht allein die desinfizierende Einwirkung schroff abgebrochen, sondern auch das Zustandekommen einer Entwicklungshem-

mung im Kulturmedium infolge etwa mit den Keimen übertragener Spuren des Desinfiziens vermieden wird.

Für viele desinfizierende Wirkungen chemischer Lösungsmittel besteht keine Schwierigkeit, dieser Forderung zu genügen. Säuren und Laugen können durch entsprechende Laugen (NH_3 , HNaCO_3) und Säuren (Essigsäure) leicht und rasch in wirkungslose Stoffe übergeführt werden, ebenso manche Oxydationsmittel durch Fermente (H_2O_2 durch Katalase) und durch Reduktionsmittel (Na-Sulfit).

In solchen Fällen werden Trockentestobjekte in Bädern der giftneutralisierenden Stoffe in Konzentrationen gespült, die an sich unschädlich sind und deren Volumen groß genug sein muß, um einen sicheren Überschuß des Bindungsmittels zu enthalten. Das dann wieder anhaftende überschüssige Bindungsmittel wird zumeist noch durch Spülen in Wasser entfernt, worauf das Material zur Einsaat in das Kulturmedium gelangt.

In Suspensionen muß das Desinfiziens durch genau bemessene Zufügungen des Bindungsmittels abgesättigt werden. Auch hier trachtet man als solches einen wenigstens in niedrigen Konzentrationen wirkungslosen Stoff zu wählen, so daß ein kleiner Überschuß des Bindungsmittels ein Fortbestehen der Einwirkung des Desinfiziens am besten auszuschließen gestattet. Die erreichte Absättigung beider kann auch durch Indikatoren angezeigt werden.

Die Überführung des Formaldehyds durch Ammoniak in Hexamethylenetetramin verläuft nach *Schneider* und *Seligmann* nicht ganz rasch und da auch dieser letztere Stoff nach denselben Autoren eine bemerkenswerte Entwicklungshemmung ausübt, so würden bei Formaldehydversuchen entweder Trockenmethoden mit relativ langfristiger Nachbehandlung im Ammoniakbad, oder Fällungsmethoden zur Trennung von Flotte und Keimen in Betracht kommen. Doch besitzt nach einer neueren Arbeit *Ohira*s das mit jenem Reaktionsprodukte chemisch identische Urotropin keine Hemmungswirkung, wenn es nicht durch Säure- oder Hitzewirkung Formaldehyd abspaltet. Bei Trockenmethoden mit Faserstoffen ist in manchen Fällen eine Verfestigung der Desinfizienzien an der Unterlage zu befürchten, sei es durch Adsorption, Absorption oder chemische Bindung, wodurch eine Wiederabgabe solcher Stoffe an das Nährmedium zustande kommen könnte. Es sind dann harte Unterlagen oder energische Entgiftungsmethoden anzuwenden. Bei Suspensionen darf die Einstellung der Verteilungsgleichgewichte zwischen den einzelnen Keimen selbst und ihrer Flotte als rasch erfolgend gedacht werden. Es genügt hier in vielen Fällen und auch bei Trockentestobjekten manchmal eine bloße mechanische Trennung von Keimen und Flotte, bei Suspensionen durch Fällung (*Zikes*, *Bellei*), Filtration oder Zentrifugieren, wiederholtes Waschen und erneute Trennung (*Schäfer*, *Gegenbauer*¹). Dies gilt besonders für die Phenole und Kresole, wie *Golowkoff* und *Laubenheimer*¹ gezeigt haben, während andere Autoren

eine Absättigung durch starke KOH- und NaOH-Lösungen (*Schneider* und *Seligmann*) oder NH_3 (*Kroenig* und *Paul*²⁾ für nötig hielten. Die Entbehrlichkeit besonderer Absättigungsmethoden für diese Gruppe von Stoffen ist auch schon aus der Erfahrung abzuleiten, daß recht beträchtlichen Dosen von Phenol — mehrere Promille —, die sogar als Zusätze bei Nährbodenrezepten auftreten, eine entwicklungshemmende Wirkung überhaupt nicht zukommt. Aus diesem Grunde erscheint es hier sogar angängig, nicht bloß auf eine eigentliche Neutralisation, sondern auch auf eine Entfernung des Desinfiziens zu verzichten, wenn durch das Kulturmedium seine ausreichende Verdünnung sichergestellt ist, wie das z. B. bei der Überimpfung von einer Öse Suspension in 10 cm^3 Bouillon (*Gruber*³⁾ oder flüssigen Agar zutrifft; Überimpfung auf Agaroberfläche wäre in solchem Falle zu vermeiden. *Czaplewski*²⁾ macht Oberflächenausstriche auf erstartem Serum und glaubt, daß das Eiweiß die phenolartigen Desinfektionsmittel ausreichend binde.

Schwierig ist die Frage der Giftneutralisation nur bei einer Gruppe von einphasigen Desinfizienten: den Lösungen der Metallsalze, wie HgCl_2 und AgNO_3 . Die hier wirksamen Gegenmittel, die Sulfide, besonders H_2S , sind selbst Zellgifte, so daß von vorneherein ein Optimum der Gegenwirkung für bestimmte relative Konzentrationen von Gift und Gegengift zu erwarten ist, dessen Lage und Wirksamkeit überdies von den herrschenden Temperaturen, von der Einwirkungsdauer des Gegengiftes und manchen Nebenumständen abhängen muß. Es wurden demgemäß auch wirklich hier mit zunehmender Verfeinerung der Technik dieser Giftneutralisation immer wieder andere und noch wirksamere Optima entdeckt, so daß dadurch die Absterbedauer für gleichartige Einwirkungen des Desinfiziens (HgCl_2) auf gleiche Testkeime (Milzbrand oder Staphylokokken) immer höher hinauf gerückt wurde (*Geppert*¹⁾, *Ottolenghi*^{2, 3)}, *Croner* und *Naumann*, *Steiger* und *Döll*, *Gegenbauer*^{1, 2)}). Die derzeit als wirksamste bekannte Giftneutralisation geschieht wesentlich nach *Ottolenghi*s Vorgang bei *Gegenbauer* (S. 25) durch Zufügung von 1 oder 2 cm^3 — je nachdem ob unter oder über 0.5% HgCl_2 angewendet war — einer $\text{n}/_5$ - H_2S -Lösung zu der Mischung aus 1 cm^3 der bisher exponierten Suspension und 10 cm^3 Bouillon unter Zufügung einer Anzahl von Kubikzentimetern einer 1%igen Krystallsodalösung, die der Prozentzahl der verwendeten HgCl_2 -Lösung gleich ist. Der Sodazusatz bezweckt die Absättigung der entstehenden Salzsäure. Die Zufügung von Serum zwecks Nährbodenverbesserung erfolgt erst eine Viertelstunde nach dem beschriebenen Vorgang, woran sich dann erst die 14tägige Kultivierung bei Bruttemperaturen schließt, bei der das überschüssige H_2S wieder entweicht.

Außer dieser technischen Schwierigkeit der Einhaltung optimaler Bedingungen der Giftneutralisation besteht aber noch die prinzipielle, daß hier keine reine Neutralisation des als überschüssig anhaftenden Desinfiziens mehr vorliegt, sondern schon eine wirkliche Entgif-

tung, eine kurative Wiederherstellung der Keime aus einem entwicklungsunfähigen Zustand, der durch eine chemische Bindung des Hg am Eiweiß der Zellen charakterisiert ist, in einen wieder entwicklungsfähigen Zustand infolge Abspaltung des Hg vom Proteinkörper durch die Sulfide. Dieses schon früher mehrfach wahrscheinlich gemachte (*Mann, Pitzmann*) Verhalten der Vorgänge wurde erst vor kurzem durch *Gegenbauers* exakte Untersuchungen² über den Chemismus der HgCl_2 -Desinfektion ganz klargestellt. *Gegenbauer* zeigte schon früher¹, daß es durch bloßes energisches Waschen der mit HgCl_2 behafteten Milzbrandsporen gelingt, sehr lange Abtötungszeiten zu erhalten, was nach dem Ergebnis der zweiten Arbeit offenbar durch eine schon so erreichbare Vermeidung der Entwicklungshemmung zu erklären ist. Die Möglichkeit, durch die angeführte H_2S -Behandlung noch zu weit längeren Abtötungszeiten zu gelangen, beruht nach eben jenem Ergebnisse auf der Abspaltung des Hg von den ohne dieses noch lebensfähigen Keimen. Es handelt sich eben bei den Versuchen ohne H_2S um eine scheinbare oder relative Abtötung, eine Entwicklungsunfähigkeit für den Fall des Ausbleibens der einschneidenden chemischen Behandlung. Auf letztere sollte aber der Ausdruck „Entgiftung“, der vielfach auch für „Giftneutralisation“ gebraucht wird, beschränkt werden.

Am schwierigsten gestaltet sich die Trennung von Keimen und Desinfektionsmittel und damit auch die Vermeidung von Täuschungen durch Entwicklungshemmung ebenso wie auch die Beurteilung der wahren Expositionsverhältnisse bei mehrphasigen Desinfektionsmitteln. *Schneider* und *Seligmann* benutzten als Entgiftungsverfahren bei Kreolinen Schütteln mit Rübölemulsionen, wonach der Tötungswert solcher Mittel weit geringer als früher angenommen erscheint. Später erklärt *Schneider* selbst die Rübölmethode für unvollkommen, behauptet aber bei Entgiftung mit Lauge dieselben ungünstigen Resultate mit Kreolinen erhalten zu haben. Auch *Hailers*³ Einwände gegen die Suspensionsmethodik stützen sich auf die Trennungsschwierigkeiten bei den teeröhlhaltigen Mitteln. Man wird immerhin auch hier, wie bei Sublimat zu bedenken haben, ob nicht für die Praxis der ohne Rüböl- oder Laugenbehandlung tödliche Vergiftungszustand der Keime genügt, die ja nach Unterbrechung der Exposition noch mit einer Hülle mit mehr oder weniger zusammenfließenden Tröpfchen der wasserunlöslichen Phase umgeben zu denken sind (*Chick und Martin*²), so daß sie dem endgültigen Absterben kaum mehr entgegen können.

Maßregeln, welche angewendet wurden, um in Strahlungsversuchen eine Täuschung durch Entwicklungshemmung zu verhüten oder auszuschließen, wurden schon oben bei Erörterung der aktinischen Exposition dargelegt, weil sie alle durch die Mitexposition von Nährstoffen oder Suspensionsmedien bedingt erscheinen.

Die Frage, welche Menge einer bisher exponierten Suspension der Giftneutralisation und Kultur zugeführt werden soll, deckt sich im

allgemeinen mit der schon erwähnten nach der erforderlichen Zahl von Testkeimen für den Einzelversuch, weil ja eigentlich diese, die Exposition beschließende Übertragung den Einzelversuch ausmacht. Wo nicht Rücksichten auf Entwicklungshemmung das überimpfte Volumen klein halten lassen, wie bei der Ösenüberimpfung der Phenolkörperversuche, ist es schon mit Rücksicht auf die volle Ausnutzung des verwendeten Materiales durchaus zu empfehlen, das ganze exponierte Suspensionsvolumen auch der Kultur, u. zw. in Teilmengen, verschiedener Expositionsdauer zu unterwerfen. *Schüders* weitergehende Forderung, die ganze Suspension in demselben Gefäße, wo sie dem Desinfiziens exponiert wurde, nach dessen Absättigung durch Zusatz konzentrierter Nährlösung in ein Kulturmedium zu verwandeln, berücksichtigt schon nicht mehr nur das für die Wirksamkeitsfeststellung allein entscheidende Verhalten der in der Flüssigkeit gleichmäßig suspendierten Keime, sondern, in Anlehnung an die Praxis der Trinkwasserdesinfektion, auch noch die an der Glaswand adsorbierten und dadurch zum Teil gegen das Desinfiziens geschützten Keimindividuen, erscheint also nur bei angewandten Versuchen am Platze. Der berechtigten Forderung, die Hauptmasse der exponierten Keime auch wirklich zu prüfen, kann unter Vermeidung zu großer Volumina und der Gefahr einer Entwicklungshemmung durch *Zikes* und *Bellei* vorgeschlagenen Fällungsverfahren entsprochen werden. Nach *Bellei* fügt man zu der auszufällenden Flüssigkeitsmenge einige Tropfen 10% iger Lösungen von Dinatriumphosphat und Chlorecalcium und trennt durch Zentrifugieren.

Seidenfäden werden zumeist als ganze in die Kulturflüssigkeit eingetragen. Zur Ablösung der Keime schütteln *Paul*, *Bierstein* und *Reuß*² sechs exponiert gewesene Granaten zusammen mit vier sterilen in 3 cm³ Wasser, durch 5 Minuten im Schüttelapparat bei 700 Stößen in der Minute.

Die Nachkultur.

Die Nachkultur der Testkeime hat, wie erwähnt, unter den günstigsten bekannten Bedingungen zu erfolgen. Im allgemeinen geht das Wachstum in flüssigen Nährböden besser als auf oder in festen von statten, die aber die Zählung überlebender Keime ermöglichen oder doch erleichtern. Bei angewandten Versuchen erscheint die Zahl überlebender Keime von besonderem Interesse, weil es für die praktische Brauchbarkeit eines Verfahrens entscheidend sein muß, ein wie großer Bruchteil der anwesenden Keime von den wirksamen Bedingungen auch tatsächlich getroffen wird (*Hailer*¹, *Reichel* und *Gegenbauer*); für Milchpasteurisierungsversuche wurden solche Zählungen durch *Eisenberg*¹ vorgenommen; wesentlich erleichtert erscheinen sie für angewandte Wasser- und Milchdesinfektionsversuche durch die quantitative Feststellung überlebender Kolikeime nach *Krombholz*², welches Verfahren grundsätzlich auch andere Keimzählungen in Flüssigkeiten gestattet. In exakten Versuchen wird die zuerst von *Geppert*¹ ange-

wendete, dann von *Paul* und seinen Mitarbeitern grundsätzlich geforderte Zählung der überlebenden Keime von jenen Autoren durchgeführt, die auf Endversuche verzichten und die Zahl überlebender Keime nach verschiedenen Zeitintervallen eines Versuches zum Maß der Desinfektionskraft machen wollen. *Geppert* und *Kroenig* und *Paul* verwenden zur Kultur sehr succulenten Agar, ersterer nur $\frac{1}{2}\%$ igen, letztere etwa 1·3% igen, offenbar, um den mit den festen Nährböden für das Wachstum verknüpften Nachteil niedrig zu halten. *Laubcnheimer*¹ empfiehlt 3% igen Agar, um die lästige Succulenz und, durch Verkehrtstellen auch das Kondenswasser zu vermeiden. *Czaplewski*² streicht, wie erwähnt, Oberflächenkulturen auf erstarrtem Serum und erklärt die Methode der Kultur in flüssigen Medien als gleichwertig, wenn nicht überlegen. Nach *Hewlett* und *Normann* sowie auch nach *Gegenbauer* und *Reichel* sind für Milzbrandsporen Agaroberflächenkulturen, nach den letzteren Autoren in Kombination mit Vorkultur in Serumbouillon der Kultur in flüssigen Medien vorzuziehen.

Die Methodik der Zählung ist die auch sonst übliche. Nach *Pauls* Vorschrift werden alle von einer bestimmten Granatenzahl abgeschüttelten Keime in einer Agarplatte kultiviert und gezählt. Es erscheint mit Rücksicht auf die durch die sehr verschiedene Keimdichte solcher Platten bedingten Fehler zweckmäßiger, nach Herstellung mehrerer Verdünnungen der Suspension und ihrer getrennten Kultivierung gleich dicht bewachsene Platten oder doch nicht allzudicht bewachsene zur Zählung zu bringen.

Die Bouillonkultur der durch die Desinfektionswirkung geschädigten Keime wurde schon durch *v. Behring*² durch den Zusatz von Blutserum verbessert, womit oft sehr wesentliche Verschiebungen der Abtötungszeiten im Vergleich zur gewöhnlichen Bouillonkultur erreichbar sind. *Schneider* und *Seligmann* bringen umfangreiche Untersuchungen über den Einfluß der Art der Nährbodenherstellung auf das Anwachsen in der Nachkultur; sie verlangen die jedesmalige Kontrolle der Brauchbarkeit einer Nährbodenpartie durch Beimpfung mit Staphylokokken, die durch 30 Minuten gegenüber 0·5% igem Lysol exponiert waren. *Süpfle* und *Süpfle* und *Dengler* bringen das Ergebnis systematischer Ermittlungen optimaler Entwicklungsbedingungen für konkrete Fälle. Es zeigt sich, daß so die bisher als maximal angenommenen Resistenzwerte noch wesentlich zu erhöhen sind.

In manchen Fällen erscheint der Tierversuch als der empfindlichere Indicator für das Überleben der Keime als die Kultur (*Geppert*¹⁻⁵), in anderen Fällen gilt das Umgekehrte (*v. Behring*^{2, 3}, *Gruber*³, *H. Hammer*, *Gegenbauer* und *Reichel*); manchmal ist der Tierversuch allein möglich, wie bei Desinfektionsversuchen gegenüber Lyssavirus (*Wanschkuhn*) und anderen invisiblen Virusarten (*Friedberger* u. *Jamamoto*). Welches das optimale Verfahren zum Nachweis des Überlebens ist, muß für alle besonderen Verhältnisse durch genaue Untersuchungen ermittelt werden.

III. Forschungsmethoden.

Die Erforschung der Entkeimungsvorgänge steht, trotz vieler daran gewandter Mühe, noch in den Anfängen. *Bürgis* Darstellung der bisherigen Ergebnisse auf chemischem Gebiete — und auch die physikalischen Einwirkungen kommen in letzter Linie als chemische (Hydrolyse, Verbrennung, photochemische Wirkung) zur Geltung — bietet ein Bild arger Widersprüche. Diese werden sich nur durch eine verschärfte Kritik der Methoden lösen lassen, die von den einzelnen Autoren angewendet wurden; u. zw. sind in gleichem Maße die experimentellen als die rechnerischen Methoden einer solchen kritischen Sichtung bedürftig.

Offenbar ist es die Aufgabe der Forschung die physikalischen und chemischen Vorgänge klarzulegen, welche den Tod oder auch die Entwicklungshemmung der in Frage kommenden Mikroben eindeutig bedingen. Es muß gerade bei den einzelligen Lebewesen besonders ausichtsreich erscheinen, die zureichenden Bedingungen des Zelltodes zu erforschen, weil hier die Umweltzustände leichter als für höhere Lebewesen zu bestimmen und zu verändern sind, und weil die rasch feststellbare Fähigkeit sich unter geeigneten Bedingungen fortzupflanzen ein bequemes, wenn auch nicht immer untrügliches Kriterium des Lebens vorstellt. Auch bildet schon jeder Einzelversuch durch die große Zahl der verwendeten gleichartigen Individuen eigentlich eine Häufung von Versuchen, so daß dem Einzelergebnisse eine Sicherheit wie sonst nur vielen Versuchen zukommt. Allerdings muß der Beweis des eingetretenen Zelltodes mit aller erreichbaren Genauigkeit erbracht werden: eine ausreichende Anzahl von Rassen oder Stämmen der untersuchten Bakterienart, eine Sicherstellung der ausreichend großen Individuenzahl im Einzelversuch, und eine Häufung gleichartiger Versuche können erst die Wahrscheinlichkeit der festgestellten tödlichen Wirksamkeit zu praktischer Gewißheit erheben; die Vermeidung oder Beseitigung wachstumhemmender Substanzen, die strenge Einhaltung der als die günstigsten bekannten Fortpflanzungsbedingungen und die weitestgehende Sicherung durch Kontrollversuche müssen Täuschungen vermeiden helfen.

1. Methoden der Beschreibung.

a) Aufnahme der Wirkungskurven.

Es handelt sich ganz im allgemeinen zunächst um die Feststellung von Intensitätsgrenzen: Temperaturen, Konzentrationen, Drucken, Wellenlängen und Energiedichten, an die sich die tötende oder hemmende Wirkung geknüpft erweist. Da die Erreichung der Abtötung eine gewisse Zeitdauer der Einwirkung zu erfordern pflegt, die naturgemäß zumeist mit den untersuchten Intensitätsgraden veränderlich ist, so wird es die Grundaufgabe der Desinfektions- und Sterilisationsforschung sein,

die Abhängigkeit der Abtötungsdauer von den willkürlich und systematisch variierten Intensitäten der einzelnen oder, wo mehrere solche zugleich in Betracht kommen, wie z. B. Konzentration und Temperatur, der zusammentreffenden Einwirkungen festzulegen.

Bei der Erforschung von Hemmungswirkungen müssen die Einwirkungszeiten immer länger sein als die kürzesten Zeiten für erkennbare Vermehrung. Hier behält also die Aufgabe ihre einfachste Form: Feststellung der Intensitätsgrenzen der Wirkung.

Solche Feststellungen sollen noch keineswegs den zur Abtötung führenden Vorgang klarlegen, sondern ausschließlich die Erscheinung des Absterbens selbst beschreiben oder in ihren Zeit- und Intensitätsgrenzen festlegen. Die Zeitdauer bis zum erfolgten Absterben ist dabei die beobachtete, abhängige Erscheinung, nicht, wie die Zeitangaben in den meisten Fällen naturwissenschaftlicher Beobachtungen, die unabhängig Veränderliche, deren Platz hier von den systematisch abgestuften Einwirkungen eingenommen wird, ein Sachverhalt, der häufig verkannt worden ist.

Die Darstellung der genannten Abhängigkeit allein bringt noch keine Aufklärung über den eigentlichen Desinfektionsvorgang, dessen Erforschung als weiteren Schritt, die Verfolgung der physikalischen und chemischen Zustandsänderungen in der Zelle in ihrer Abhängigkeit von den Außenbedingungen voraussetzt. Die Abhängigkeit der Absterbedauer von den wirkenden Bedingungen ist — im Gegensatz zu jenem eigentlichen Desinfektionsvorgange — immer ohne Schwierigkeit klarstellbar, u. zw. durch Versuchsanordnungen, wie sie im vorausgehenden Kapitel für exakte Abtötungsversuche beschrieben worden sind: Eine große Zahl nach Möglichkeit gleichartiger Keime wird von einem tunlich genau festgestellten Zeitpunkte an der Einwirkung ausgesetzt und wieder zu einem ebenso bestimmten Zeitpunkte entzogen, um ehestens unter Bedingungen gebracht zu werden, die bei erhaltener Lebensfähigkeit eine Vermehrung der Keime gestatten oder begünstigen. Wiederholungen solcher Versuche mit anderer Zeitdauer führen — unter der Voraussetzung, daß das Absterben in allen Einzelversuchen tatsächlich nach der gleichen Zeit erfolgt — zu einem positiven und einem negativen zeitlichen Grenzwerte der Lebensfähigkeit für eben die gewählten Bedingungen. Der erstere Wert bildet das sichere Minimum, der letztere das anscheinende Maximum der Lebensdauer unter den gegebenen Umständen. Auch wo es sich wie bei Hemmungsversuchen um die bloße Erhebung der Intensitätsgrenzen der Wirkung handelt, ist die untere festgestellte Grenze als die sicher unzureichende, die obere nur als die scheinbar zureichende zu betrachten. Der Unterschied in der Sicherheit beider Zahlwerte ergibt sich daraus, daß die nicht gelungene Tötung oder Hemmung aus dem Versuche einwandfrei hervorgeht, die gelungene jedoch immer dem Einwand Raum gibt, Tod oder Hemmung

seien aus anderen Gründen als durch die untersuchten Einwirkungen eingetreten oder gar nur vorgetäuscht worden. Da nun der gesuchte Wert der zureichende, also der minder sichere ist, so erscheint die Wiedergabe des unzureichenden, sichereren Wertes schon deshalb, dann aber auch darum erforderlich, weil nur der Abstand beider Zahlwerte die Genauigkeit der Feststellung erkennen läßt.

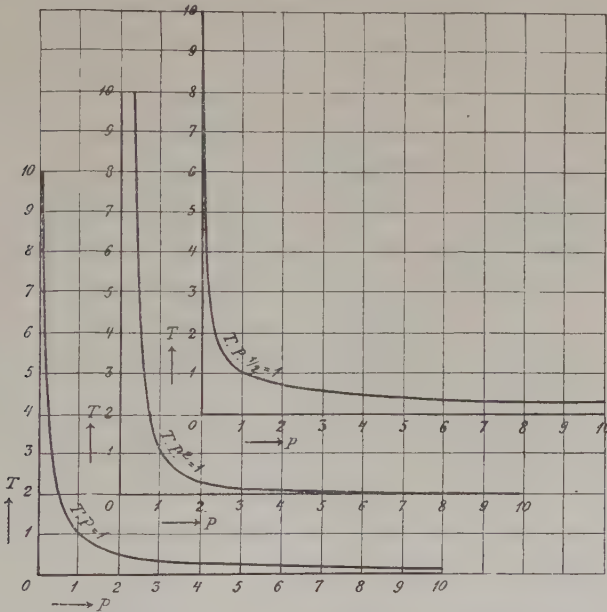
Für jede Desinfektionswirkung können grundsätzlich. beliebig viele solche Wertpaare erhoben werden: entweder die Zeitwerte für die verschiedenen Intensitäten oder die Intensitätswerte für zeitlich verschieden definierte Wirkungen. Alle solchen Werte sind am einfachsten als Punkte in einem Zeit-Intensitäts-Koordinatensystem vorzustellen oder einzutragen, wobei erwartet werden muß, daß sich die unteren sowohl als die oberen Resistenzgrenzpunkte zu stetigen Grenzlinien im zeitlichen Wirkungsfelde zusammenschließen oder, nach bekannten Regeln der Ausgleichsrechnung, zu Kurven vereinigen lassen werden, die die maximale und minimale Absterbedauer als Funktion der Intensität darstellen. Diese Wirkungskurven zu finden und durch adäquate Gleichungen zu beschreiben, muß offenbar die erste Aufgabe einer jeden Desinfektionsforschung sein, schon zu dem bloßen Zwecke der präzisen Festlegung der Beobachtungen und der tunlich vereinfachten Vorhersage für noch unerforschte Teile des Wirkungsgebietes, welche Vorhersagen sich allerdings nach bekannten Grundsätzen auf Interpolationen zwischen tatsächlichen Beobachtungen werden zu beschränken haben.

Die allgemeine Form solcher Kurven oder Gleichungen wird, wie eine einfache Überlegung lehrt, die von hyperboloiden Linien sein. d. h. es wird das Produkt aus den beiden Veränderlichen: T (Zeitdauer) und P (Konzentration, Intensität), oder auch aus deren einfachen Funktionen, zumeist Potenzen, ein konstantes sein müssen. Dies besagt nicht mehr, als die Selbstverständlichkeit: je stärker die Einwirkung, desto kürzer die Absterbedauer, je schwächer, desto länger. Nähert sich die Konzentration dem Werte Null, so wird die Abtötungszeit naturgemäß immer länger, schließlich unendlich lang werden und umgekehrt wird im allgemeinen bei sehr hohen Konzentrationen eine sehr kurze Abtötungszeit, im Extrem vom Werte Null erreichbar sein.

Die entsprechende Form der Gleichung hat also zu lauten: $T \cdot P^n = R$, worin R die Resistenzkonstante bedeutet, die, abgesehen von den zunächst als gleichbleibend gedachten Einflüssen von Temperatur- und Lösungsgenossen, nur von der Natur des Desinfiziens und der Keime abhängt. Der ebenfalls konstante Exponent charakterisiert in den meisten Fällen ausreichend die Krümmung der hyperboloiden Kurve. Er könnte ebensowohl durch einen konstanten Exponenten, z. B. m, des Zeitwertes T ersetzt werden, in welchem Falle auch anstatt R ein anderer Wert, z. B. D, die Dosis- oder Desinfizienskonstante, auftreten müßte,

so daß die Gleichung dann lauten würde: $T^m \cdot P = D$, wobei dann selbstverständlich gilt: $m = 1/n$, und $D = R^{1/n} = R^m$ und $R = D^n$. Für den praktischen Gebrauch empfiehlt es sich, jene Größe in ihrer ersten Potenz zu belassen, die man rasch in entwickelter Form berechnen will. Meistens ist dies die Zeit, wie lange bei einer gegebenen Konzentration auf die Wirkung gewartet werden muß, wofür also die erste Form der Gleichung zweckmäßiger erscheint. Für die Beurteilung eines neuen Mittels muß aber die Konzentration für eine bestimmte zeitliche Leistung berechnet werden, so daß hier die zweite Form bequemer ist. Wie ohneweiters ersichtlich, stellt in jedem

Fig. 182.



Falle, d. h. bei beliebigem n - oder m -Werte, die Konstante R die Zeit bis zur erreichten Abtötung für den Konzentrationswert 1 und die Konstante D die zureichende Konzentration für die Wirkung in der Zeiteinheit vor. Es liegt also nahe, wie oben geschehen, den ersteren Wert als die Resistenzkonstante der Keime gegen das Mittel, den letzteren als die Dosiskonstante des Mittels gegen die Keime zu benennen. Als „Desinfektionskraft“ könnte nur der reziproke Wert von D , d. h. also jene Verdünnung definiert werden, die die Testkeime in der Zeiteinheit tötet; doch erscheint es kaum zweckmäßig, diese Bezeichnung einzuführen, weil sie dazu verleitet, als Eigenschaft des Mittels schlechtweg betrachtet zu werden. Im Falle $n = 1$ fallen beide Konstanten R und D zusammen. Das Kurvenbild in diesem Falle, d. h. für das einfache Produkt der Variablen: $T \cdot P = R = D$, ist die rechtwinkelige Asymptoten-Hyperbel, deren Äste sich den Koordinatenachsen in symmetrischer

Weise nähern. Eine von 1 abweichende Potenz der P-Größe im konstanten Produkt äußert sich im Bilde durch Asymmetrie der hyperboloiden Kurve, die für Potenzen über 1 dem P-Aste, für Bruchpotenzen dem T-Aste sich steiler anschmiegt als dem anderen. Je mehr der konstante Exponent n (oder m) der Gleichung von 1 abweicht, desto stärker die Asymmetrie (Fig. 132).

Ausnahmen von diesem typischen Verhalten werden zu erwarten sein, wenn entweder das Desinfiziens nicht in jeder Konzentration überhaupt wirkt oder wenn seine rasche und vollständige chemische Bindung nach konstantem Verhältnis an den Körper der Keime als zureichende Ursache einer nachfolgenden Abtötung zu betrachten ist. Im ersteren Falle ist naturgemäß nur der über den Schwellenwert hinausgehende Teil der Konzentration in Rechnung zu stellen, im letzteren ist zu erwarten, daß die Dauer bis zur erreichten Wirkung jenseits einer gewissen Grenze von der Konzentration überhaupt nicht abhängt, womit das Kurvenbild einer solchen Wirkung in eine der P-Achse parallele Gerade übergeht.

Zum ersten Male wurde eine solche Desinfektionswirkungskurve 1897 von *Ikedo* im Anhang zur Arbeit von *Kroenig* und *Paul*² (S. 97) richtig aufgestellt, wo auch schon ihr praktischer Wert erwähnt wird. Da aber der Autor nicht näher darauf eingeht und die Bemerkung unter anderen minder überzeugenden mathematischen Ableitungen steht, wurde sie offenbar wenig bemerkt. *Wo. Ostwald*¹ benutzte dann 1905 derartige Kurven zur graphischen Darstellung der Giftigkeit des Seewassers und seiner Bestandteile für Süßwassertiere (Gammaruskrebse), wobei er auch schon für die NaCl-Kurve das annähernde Zutreffen der Hyperbelfunktion: $T \cdot P = \text{Konstante}$, bemerkt. Er stellt dann² 1907 für dieselben Versuchsergebnisse die allgemeine Gleichung: $T \cdot P^n = \text{Konstante}$, auf und deutet sie als Ausdruck einer Salzadsorption, worauf unten zurückzukommen sein wird. Im Jahre 1908 haben dann *Hariette Chick*¹ (S. 119 ff.) und *Reichel*¹ (S. 97), unbeeinflusst von den bisher genannten Autoren und voneinander, solche Kurvenlinien zur Darstellung von Desinfektionsversuchsergebnissen verwendet und erörtert. *H. Chick* gibt ihnen dort die mathematisch verwickelte und sachlich unbegründete Fassung (in obiger Schreibweise): $T \cdot P = K P^2$, zu der ihr mathematischer Gewährsmann *I. C. G. Leddington* offenbar durch den Umstand gedrängt wurde, daß er als erste eine Phenolkurve aufzustellen hatte, die, wie *Reichel*² (S. 212) später zeigen konnte, eine etwas andere als die einfachste Form besitzt. *H. Chick* überträgt ihre Phenolgeichung ohne Notwendigkeit auch auf die Darstellung von HgCl_2 - und AgNO_3 -Versuchen und muß, um die Unverwendbarkeit dafür aufzuklären, zu hypothetischen und nicht überprüfbaren Annahmen über den als allein wirksam angenommenen ionisierten Anteil greifen, womit der darstellende und praktische Wert einer solchen Gleichung verschwindet. In einer im gleichen Jahre folgenden Arbeit mit *Martin*¹ (S. 679) wird jedoch, unter Berufung auf *Watson* als mathematischen Autor, eine Gleichung zur Berechnung der erforderlichen Konzentration bei gegebener Zeitdauer angegeben, die in unserer Schreibweise: $T \cdot P^n = 1$ lauten würde, offenbar nur ein Spezialfall der richtigen allgemeinen Formel. *Reichel* hat 1909² (S. 222—227) die Wirkungskurven in der oben gegebenen Form, nur in etwas abweichender Schreibweise berechnet und ausführlich in ihrer Bedeutung erörtert. Er stellt für H_2O_2 -Wirkungen eine Gleichung auf, in der $n=0.5$ zu setzen ist, während sich für Phenol, weil es nicht in allen Konzentrationen giftig wirkt, die Notwendigkeit ergibt, vom Konzentrationswerte P einen konstanten Abzug p zu machen, der die dauernd unwirksame Dosis des Stoffes bedeutet, so

daß die Phenolgleichung und zugleich auch die allgemeinste Form der Giftgleichung überhaupt $T \cdot (P-p)^n = R$ lautet. Wo. Ostwald und Dernoschek haben dann 1910, anscheinend ohne die vorstehenden Ableitungen zu kennen, genau die gleiche Form der allgemeinsten Gleichung für Salzgiftwirkungen aufgestellt, indem sie die indifferente Salzkonzentration von der gesamten abziehen, um nur die als Gift wirksame zu erhalten (s. auch Dernoschek 1911 und Hartmann 1918). Rechnerisch befassen sich 1910 auch Morawitz und Freundlich mit der Frage, indem sie aus den Versuchsdaten von Kroenig und Paul² die gleiche Beziehung wie schon Ikeda herleiten, worin für Sublimat $n = 0.76$ wird. Die Autoren schließen daraus auch wieder auf Adsorption. Paul, Bierstein und Reuß stellen ebenfalls 1910⁴, anscheinend auch wieder unabhängig von allen früheren Autoren, eine Gleichung wesentlich derselben Art für die Sauerstoffwirkung auf Bakterien auf und legen dann noch im gleichen Jahre² (S. 217—225) die ganze Frage in Anknüpfung an Ikeda und Chick in der Hauptsache richtig, wenn auch nicht ohne Mißverständnisse, dar und stellen S. 237—245 für Säurewirkungen auch neue solche Gleichungen auf. In ganz ähnlicher Weise, nur mathematisch eleganter, gelangt Phelps (1911) wie Paul und seine Mitarbeiter auch über den Umweg der Gleichung Madsens und Nymanns auf die richtige Beziehung, die wieder als völlig neu bezeichnet, in mancher Hinsicht sehr zutreffend — z. B. hinsichtlich ihres Verhältnisses zur Resistenz des Testmaterials und der Desinfektionskraft des Mittels — erörtert wird, während in anderen Punkten schwere Mißverständnisse unterlaufen. Gegenbauer und Reichel geben dann 1912 ein System solcher Gleichungen für die HCl-Wirkung gegen Milzbrandsporen, wobei auch die Methodik ihrer Gewinnung und das Verhältnis zu den praktisch minder brauchbaren Gleichungen Pauls und seiner Mitarbeiter dargelegt wird. Ganz analoge Gleichungen wurden inzwischen mehrfach zur Darstellung hämolytischer Wirkungen verwendet, so von Gros¹ 1910 und von Stadler und Kleemann 1911; auch hat K. B. Lehmann solche Kurven und Gleichungen zur Darstellung der menschlichen und tierischen Giftresistenz in gewerbehygienischen Fragen, zuerst 1911, in ausgedehntem Maße benutzt.

Endlich tritt Gregersen 1916 mit identischen Gleichungen, u. zw. für HCl-, $HgCl_2$ -, HCOH- und Phenolwirkungen gegen Staphylokokken mit der Methodik Pauls, jedoch in Endversuchen gewonnen, auf und erörtert ihre praktische und theoretische Bedeutung in der Hauptsache richtig. Er bezeichnet diese Darstellungsmöglichkeit als ein „Gesetz“ und glaubt überraschenderweise auch wieder es zuerst gefunden zu haben, obwohl er sich auf die grundsätzliche Übereinstimmung mit den Gleichungen von Reichel² und Paul, Bierstein und Reuß^{1, 2} im einzelnen beruft. Für die Konstante der Gleichung will Gregersen den Namen Desinfektionskonstante einführen; da aber seine Schreibweise (in unseren Zeichen) $T \cdot P^n = R$ lautet, wäre es richtiger, sie Resistenzkonstante zu nennen. Zuletzt hat Gegenbauer 1920 auch die oben angeführte Möglichkeit eines geradlinigen, der P-Achse parallelen Verlaufes der Wirkungskurve, deren Gleichung dann einfach: $T = R$ lautet, bei Sublimatversuchen an Milzbrand und Staphylokokken bei Einhaltung bestimmter Methoden verwirklicht gefunden.

Die einfachste Methode zur Feststellung solcher Kurven und Gleichungen ist oben schon angedeutet: die in den Einzelversuchen gewonnenen maximalen und minimalen Abtötungszeiten werden auf Millimeterpapier als Ordinatenendpunkte übereinander mit verschiedenartigen Zeichen oder Farben in jenem Abszissenabstand eingetragen, der der jeweiligen Wirkungsintensität, etwa Konzentration, entspricht. Nach Eintragung aller, mindestens dreier solcher Punktpaare, kann die graphische Ausgleichung zu einer maximalen und einer minimalen Kurvenlinie erfolgen, aus deren Verlauf auf die als zwischen ihnen liegend zu gewärtigenden Abtötungszeiten bei anderen als den unter-

suchten Konzentrationen oder aber auf die erforderlichen Konzentrationen für andere Abtötungszeiten ohneweiters geschlossen werden kann.

Eine weitergehende ziffernmäßige Erfassung, d. h. die Niederlegung des Ergebnisses in einer Gleichung mit den Variablen Zeitdauer und Intensität (Konzentration) ist wohl in fast allen Fällen wünschenswert. Sie geht von dem Versuche aus, ein konstantes Produkt der Variablen oder ihre Potenzen zu finden, wobei die Maximal- und Minimalwerte am besten ganz unabhängig nebeneinander in Betracht gezogen werden. Die Genauigkeit der gemessenen Werte berechtigt zumeist nur zu einer groben Abstufung des konstanten Exponenten n in einfachen Ganz-, oder in einfachen Bruchzahlen. Erweist sich für die vorliegenden Koordinatenpaare das einfache Produkt zunächst als inkonstant, so wird der Rechenversuch mit dem Produkte aus Zeitdauer und Quadrat oder 2. Wurzel — je nach der Richtung des Ganges des Konzentrationswertes — wiederholt; nötigenfalls folgt die 3., auch 4. Potenz oder Wurzel. Für irgend eine dieser Reihen wird dann der Gang der Produktwerte als umgekehrt hervortreten und die dazwischenliegende, leidlich konstante Reihe wird endlich als bester Ausdruck der Beobachtungen gewählt. Zeigt keine Reihe befriedigende Konstanz der Werte, sind die Produktzahlen schon in zwei benachbarten Reihen mit ganzzahligen Potenzwerten gegenläufig, so ist eine passende Reihe mit einfacher bruchzahliger Potenz leicht einzuschalten, die dann der besten Gleichung entspricht. Zur Erläuterung diene folgendes Beispiel, das die Abtötung von Milzbrandsporen durch Salzsäure bei 25° wiedergibt (aus *Gegenbauer und Reichel*, S. 35).

P = Konzentration in Prozent	T ₁ = minimale Abtötungszeit in Stund.	T _a = maximale Abtötungszeit in Stund.	n = 1		n = 1.5		n = 2	
			T ₁ · P	T _a · P	T ₁ · P ^{1.5}	T _a · P ^{1.5}	T ₁ · P ²	T _a · P ²
1.0	20.80	27.80	20.8	27.8	20.8	27.8	20.8	27.8
2.0	6.95	8.69	13.9	17.4	19.7	24.6	27.8	34.8
4.0	3.13	3.90	12.5	15.6	25.0	31.2	50.1	62.4

Es wird darin versucht, die allgemeine Form der Gleichung $i \cdot P^n = R$, den vorliegenden Beobachtungswerten anzupassen. Der Exponent $n=1$ liefert für maximale und minimale Zeiten eine Reihe fallender, der Exponent $n=2$ eine solche steigender Produkte, für den Exponenten 1.5 ($\frac{3}{2}$) kann jedoch ohne Zwang der Wert $R=25$ als konstant angesehen werden, so daß die Gleichung $T \cdot P^{1.5} = 25$, die Beobachtungen ausreichend beschreibt. Die Wahl des besten R -Wertes muß so erfolgen, daß er hinter keinem der Minimalwerte, die ja feststehen, zurückbleibt, während Überschreitungen der Maximalwerte, die nur als wahrscheinlich zu gelten haben, zulässig sind.

Mathematisch eleganter kann die Ermittlung der 2 Konstanten der Gleichung auch so erfolgen, daß die Koordinaten zweier durch die Be-

obachtungen gut gestützten Punkte der graphisch ausgeglichenen Kurve: T_1 , P_1 und T_2 , P_2 in die Gleichung eingesetzt und deren Konstanten daraus berechnet werden, wobei sich der Exponent als $n = \log T_2/T_1 : \log P_1/P_2$ ergibt (*Reichel*²). Auch ist die analoge Methode anwendbar, die *Wilhelm Ostwald*² (2. Band, S. 232) zur Auswertung von Adsorptionsversuchen angibt, da ja zwischen der Desinfektionsgleichung und der Adsorptionsisotherme völlige formale Übereinstimmung herrscht (s. *Wo. Ostwald*²). Es sind dann die Logarithmen der zusammengehörigen T- und P-Werte in einem Koordinatensystem einzutragen; durch den Schwarm der Punkte ist eine, u. zw. die bestpassende Gerade zu ziehen, deren Neigungswinkel α gegen die P-Achse dann den Exponenten als $n = \tan \alpha$ entnehmen läßt; paßt keine Gerade leidlich, so ist eben die Form der Gleichung nicht die einfachste.

Falls ein Schwellenwert der Wirksamkeit für die Konzentration wie bei Phenol vorliegt, so ist dieser Wert p als dritte Konstante der Gleichung: $T \cdot (P - p)^n = R$ zu bestimmen, was grundsätzlich aus drei Koordinatenpaaren möglich sein müßte, jedoch wegen der Stellung der einen Unbekannten als Exponent der anderen keine elementare Lösung zuläßt. Der Schwellenwert ist in solchen Fällen am besten durch langfristige Versuchsreihen so genau als tunlich experimentell zu bestimmen (*Reichel*², S. 213), kann auch, minder genau, graphisch durch Zeichnung einer der T-Achse parallelen Asymptote der Wirkungskurve gefunden werden, wobei p gleich dem Abstände der Asymptote von der T-Achse ist.

Die Genauigkeit der ermittelten Konstanten läßt sich bei der zuerst dargelegten primitiven Methode ihrer Ermittlung nicht zahlenmäßig festlegen. Bei Verwendung der letzteren Methoden liegt aber kein Hindernis vor, noch die genauere Berechnung der Wirkungskurve nach den Regeln der Ausgleichsrechnung durchzuführen, woraus sich dann auch Zahlen als Maß der Sicherheit der Einzelbeobachtung und Vorhersage und der Zuverlässigkeit der berechneten Konstanzwerte ergeben würden. Doch erübrigt sich die Wiedergabe der einschlägigen Rechnungsarten, da sie in jedem Lehrbuche der Ausgleichsrechnung gefunden werden können*, und da die Anwendung einer so zeitraubenden Methode in Anbetracht der damit erreichbaren Verbesserung der Darstellung nur selten gerechtfertigt erscheinen wird. Auch ohne solche Rechnung geben die mehr oder weniger gute Konstanz der Werte für die empirisch festliegenden Koordinatenpaare, die Zahl dieser Punktpaare und der Abstand der Maximal- und Minimalwerte genug Anhalt für die Beurteilung.

Für das Ergebnis an Genauigkeit ist die Versuchsanordnung entscheidend. Da zunächst die berechneten Beziehungen immer nur für den untersuchten Bereich gelten können, wird es erforderlich sein, Reihen streng vergleichbarer Einzelversuche von vornherein über den

* S. z. B. *Weitbrecht*, Ausgleichsrechnung. Sammlung Goeschel.

ganzen oder doch einen tunlich großen Teil des belangvollen Wirkungsbereiches zu erstrecken. Hierfür empfiehlt es sich, wie auch in anderen Fällen, die Variation der willkürlich veränderlichen Versuchsbedingungen nach Stufen einer geometrischen Reihe vorzunehmen, nicht einer arithmetischen, wodurch immer eine ungleichmäßige und nur schwer eine sehr weitreichende Verteilung der Punkte im Koordinatenfelde zustande käme. Als Beispiel diene das obige, wo der HCl-Gehalt in den geometrischen Stufen 1, 2, 4% gewählt war; wäre hier Anlaß zu weiterer Ausdehnung der Versuchsreihe, so wäre nicht 1, 2, 3, 4, 5, sondern 1, 2, 4, 8, 16, oder auch $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ zu wählen gewesen. Soll nicht der Bereich vergrößert, sondern die Dichte der Versuche vermehrt werden, so muß anstatt der sich immer zunächst aufdrängenden Zweierreihe eine andere, niederere gewählt werden, z. B. die 1·5fache Reihe — aus Bequemlichkeitsrücksichten in abgerundeten Zahlen — 1, 1·5, 2·3, 3·3, 5·0, 7·5, 11·2, oder auch die $\sqrt{2}$ -Reihe: 1, 1·4, 2, 2·8, 4, 5·6, 8, 11·2, oder die des goldenen Schnittes: 1, 1·6, 2·6, 4·2, 6·8, 11·0. Die letztere bietet bekanntlich den Vorteil, daß jedes neue Glied durch einfache Addition der zwei vorausgehenden zu finden ist, so daß ihre Anwendung auch denkökonomisch den arithmetischen Reihen fast gleichkommt.

Bei der zweiten, der beobachteten Veränderlichen kommt es darauf an, durch die richtige Wahl des Überimpfungs- oder Unterbrechungszeitpunktes den Abstand zwischen den zwei zusammengehörigen Grenzwerten recht klein zu gestalten, was ja durch Häufung der Überimpfungen grundsätzlich immer erreichbar ist. Da aber die zur Überimpfung gelangende Keimmenge nicht allzu klein sein darf und auch Gründe der Materialersparung gegen eine allzu große Häufung der Überimpfungen sprechen, wird man trachten müssen, diese nur in jenen Zeiträumen gehäuft vorzunehmen, wo die Erreichung der Grenze am wahrscheinlichsten zu erwarten ist. Liegen hierüber zunächst gar keine Anhaltspunkte vor, so wird in einem Vorversuche am besten auch hier eine geometrische Reihe von Zeitwerten über große Zeiträume gespannt; ist aber dann der Zeitpunkt des Absterbens ungefähr bekannt, so wird im Hauptversuche eine arithmetische Reihe von Überimpfungszeitpunkten — geometrische Reihen wären bei rascher Aufeinanderfolge der Überimpfungszeitpunkte sehr unbequem — in der Umgebung jenes wahrscheinlichsten Punktes angeordnet. Der Gradient solcher Reihen wird womöglich in einem konstanten, der angestrebten Genauigkeit entsprechenden Verhältnisse, z. B. $\frac{1}{10}$ oder $\frac{1}{100}$, zur jeweils erwarteten Absterbedauer zu stehen haben. Oft wird man sich allerdings bei kurzen Zeiten mit einer relativ geringeren Genauigkeit begnügen müssen, als sie bei den längeren Zeiten leicht zu erreichen ist.

b) Absterbekurven.

Bekanntlich sind die in irgend einer Vielheit zusammengefaßten Einzellebewesen niemals völlig gleichartig, auch dann nicht, wenn sie

— wie für bakteriologisches Testmaterial von Desinfektionsversuchen unbedingt zu fordern ist — Reinkulturen gemeinsamer Abstammung und gleichen Alters, unter gleichen Umweltbedingungen gezogen, vorstellen. Die Einzelindividuen solcher Kulturen sind ja doch von verschiedenem Alter, weil die Teilungsvorgänge aus äußeren oder inneren Gründen in einzelnen Teilen der Kultur verschieden rasch verlaufen und wahrscheinlich von Anfang an ein gewisser Bruchteil jeder Generation die weiteren Teilungen nicht mitmacht. Aber auch sonst lehrt uns jede Erfahrung mit Lebendigem, daß völlige Gleichheit, offenbar infolge der verwickelten Natur der Lebensvorgänge, nicht vorkommt. Die Streuung der Abweichungen vom Mittel- oder Durchschnittswert einer meßbaren Eigenschaft verteilt sich um diesen bekanntlich im allgemeinen symmetrisch nach der sog. Fehler- oder Binomialkurve. Je größer die Zahl der Einzelfälle, desto besser pflegt sich diese Verteilung herzustellen. Würde das Gesetz in seiner einfachsten Form auch für unseren Fall schrankenlose Geltung haben, so würde es besagen, daß unter gegebenen Bedingungen die Absterbedauer der „gleichartigen“ Keimindividuen um einen Mittelwert symmetrisch schwankt, und daß grundsätzlich jede höhere Absterbedauer noch für einzelne Keime zur Beobachtung kommen könne, ja müsse, wenn nur die Zahl der Keime entsprechend groß war. Solche Erwägungen würden das Resultat des oben geschilderten Grundversuches, eines „Endversuches“, offenbar als allzu abhängig von geringen Unterschieden der Versuchsanstellung erscheinen lassen, da ja ein überlebender Keim genügt, um wieder Wachstum, also negativen Ausfall der Entscheidung zu bewirken. Man würde — wenn der Einwurf zu Recht bestünde — mit jenem Versuch mehr eine indirekte und höchst ungenaue Zählung, als eine Messung der zeitlichen Widerstandskraft der Keime vornehmen. Man ist deshalb davon abgegangen, das bloße Überleben oder Nichtüberleben von Keimen überhaupt festzustellen und hat versucht, die Zahl der bis zu bestimmten Zeitpunkten abgestorbenen, oder eigentlich unmittelbar die Zahl der dann noch überlebenden Keime als Grundlage der Messung zu wählen (*Kroenig* und *Paul*², *Madsen* u. *Nyman*, *H. Chick*^{1, 2}, *Paul*², *Paul*, *Bierstein* u. *Reuß*^{1, 2}). Aus solchen Feststellungen ergibt sich, wenn in gewissen Zeitabschnitten ein bestimmter Bruchteil der gesamten Versuchsmenge an Keimen zur Zählung verwendet wird, eine fallende Zahlenreihe der Überlebenden, deren kurvenmäßig ergänztes, stetiges Bild, wie eine kurze Überlegung lehrt eben nichts anderes ausdrückt, als jene oben erwähnte Resistenzstreuung, welche daraus in klarerer Form berechnet und dargestellt werden kann, wenn die Zahl der in fortschreitenden Zeiträumen abgestorbenen Keime, nicht die Zahl der Überlebenden, als Zeitfunktion graphisch wiedergegeben wird. Eine andere Auffassung dieser stetigen Reihe ist nur in solchen Fällen noch denkbar, wenn nicht alle Keime gleichzeitig von der zu untersuchenden Einwirkung ge-

troffen werden müssen, was durch Verklumpung oder durch Erhaltenbleiben der beim Wachstum sich ausbildenden natürlichen Lagerung zustande kommen kann. In solchen Fällen handelt es sich jedoch wie im vorigen Kapitel erwähnt, um Versuchsfehler oder um eine von vorneherein verfehlte Versuchsordnung, wenigstens für Untersuchungen, die Anspruch auf Exaktheit und theoretische Geltung ihrer Ergebnisse machen.

Ganz unzulässig muß es aber erscheinen, jene stetige Reihe als den Ausdruck eines Vorganges, des Absterbevorganges selbst zu betrachten, wenn auch ihre Gestalt als Zeitfunktion dazu verleiten möchte.

Madsen und Nyman (1907), Chick¹ (1908), Chick und Martin¹ (1908), Paul² (1910), Paul, Bierstein und Reuß^{1, 2} (1910), Phelps (1911) verfallen in diesen Fehler, auf den Eijkmann² (1908), Reichel² (1909), Hewlett (1909) und Reichenbach^{3, 1} (1910, 1911) hinweisen. Bei letzterem¹ findet sich die ausführlichste Darstellung der Frage, eine kürzere bei Bürgi (1913).

Die oft herangezogene Analogie zum Verlaufe der monomolekularen chemischen Reaktionen ist unstatthaft. Allerdings ist deren zeitliche Ablaufsform, die im Verhältnisse zur vorhandenen Masse gleichbleibende Umsetzungsgeschwindigkeit, häufig auch bei der Absterbefolge der Keime ausreichend genau verwirklicht, indem oft die Zahl der jeweils sterbenden Keime der Zahl noch vorhandener durch längere Zeit leidlich genau proportional bleibt. Es handelt sich jedoch hier um eine überhaupt in der Natur sehr häufig annähernd verwirklichte Maßzahlbeziehung, die gerade für jene Absterbefolge häufig genug auch durchaus nicht zutreffend ist. Bei den monomolekularen Reaktionen sind ja die Bedingungen der Umsetzung offenbar deshalb von der Dichte des Stoffes abhängig, weil es auf die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von Molekülen — sei es der eigenen Gattung, sei es des Lösungssstoffes oder auch solcher des Lösungsmittels — also immer von Teilchen kommensurabler Zahl und Größe ankommt. Die zum Absterben führenden Umweltbedingungen im Desinfektionsversuche sind aber — richtige Anordnung vorausgesetzt — für jeden Keim genau dieselben und unabhängig von der Zahl der ihnen ausgesetzten Keime, da die Träger oder Elemente aller Arten thermischer, chemischer oder aktinischer Einwirkung, bei tödlicher Wirksamkeit immer in inkommensurabler, im Vergleiche zur Keimzahl unendlicher Zahl zur Geltung kommen. Diese Gleichmäßigkeit der Einwirkungen auf alle ihnen ausgesetzten Keime läßt das Ergebnis einer ungleichen Absterbedauer eben nicht anders als aus der von vorneherein ungleichen Widerstandskraft der Keime verstehen, worauf schon Geppert³ hinwies, nachdem er gezeigt hatte, daß die Erscheinung auch beim Kochen auftritt, wobei sie ja keinesfalls anders zu erklären war. Die von H. Chick² (S. 282—285) zur Erklärung herangezogene Annahme einer periodischen Resistenzschwankung der Einzelkeime, die in jedem Augenblicke nur einen bestimmten Bruchteil aller Keime gegen das Desinfizienz hinfällig macht, ist bisher durch keine Beobachtung oder auch nur Analogie gestützt, erscheint also unzulässig.

Die Ungleichheit der Widerstandskraft war also zu erwarten, überraschen kann nur die Form der Streuung der Abweichungen vom Mittelwerte. Der häufig annähernd verwirklichte Fall des der jeweiligen Keimzahl selbst proportionalen Absinkens der Keimzahlen ergibt für die Betrachtung der zwischen zwei Zeitpunkten abgestorbenen Keime eine äußerst unsymmetrische Verteilung der zeitlichen Resistenzwerte, indem im ersten faßbaren Zeitabschnitte der Einwirkung schon mehr Keime erliegen als in jedem folgenden. Es ist aber auch durchaus denkbar und in vielen anderen Fällen beobachtet, daß biologische Eigenschaften solche stark asymmetrische Streuungen aufweisen.

„*postponere*“ ist möglich, daß aus der der von vernachlässigten Keimzahl aus der Keimzahlgleichung aus der Zeit begünstigenden Annahme resultiert, daß die Wachstumsleistung der aufeinanderfolgenden Generationen einer Keimzahl infolge der Verminderung der Keimzahlen fortwährend abnimmt.

Das Wachstumsvermögen von Organismen, gegen welche die Auswirkungen auf die Vermehrung bei einer gewissen Anzahl von Individuen eine solche asymmetrische Verminderung aufweisen, scheint nämlich einer solchen Schädlichkeit fast alle Individuen in ganz kurzer Zeit zum Opfer fallen. Tatsächlich zeigen auch viele „*postponere*“ Versuche¹⁾, daß im Hinblick auf Zeit solange langsame vor sich geht und erst dann ein Wendepunkt tritt, daß der gesamte Verlust aus von einem von Anfang an proportional mehr oder weniger abnimmt. In diesem Falle liegt das erwähnte Kriterium der Keimzahlgleichung für weitere Zeitwerte auch wirklich vor. Es scheint auch, daß man ganz allgemeine Verhältnisse der relativen Abweichungen, Wachstumsraten würden sehr langfristige Desinfektionsversuche mit sehr vollkommenen Formeln für Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen.

Das nächste Überlegung lehrt ferner, wie schon im vorigen Kapitel erwähnt, daß die für die Wachstumsfaktoren gebildete asymptotische Verlauf, d. h. die Unabhängigkeit des Fortschritts immer noch höherer Werte bei steigender Konzentration, für die Bestimmung der Keimzahlwerte im Desinfektionsversuche ungeeignet sein kann, und das ganz allgemein bekannt, die die Lebensfähigkeit aus der Wachstumsleistung, Keimzahlwerte selbst oder bei längeren Perioden nicht ausreicht.

Es stellt also zur Genüge fest, daß die Verfolgung der Absterbezeitung der Keime eine Aufklärung des Absterbevorganges nicht mit sich bringt. Der sog. Desinfektionsgeschwindigkeitskoeffizient K in der Gleichung:

$$T = \frac{1}{K} \ln \frac{n}{n'}$$

wobei T die Zeitraum, n die Ausgangs- und n' die Endkeimzahl vorstellt und welche Gleichung, wie erwähnt, keineswegs immer, aber doch häufig ausreichend verläßt, kommt somit also die im Namen ausgedrückte, je übersteigt kann eine grundsätzliche Bedeutung für die Beschreibung des Desinfektionsverlaufes zu. Es wäre richtiger, will man einen die Keimzahlbestimmung innerhalb der gegebenen Keimmenge in Betracht ziehen, die Geschwindigkeit und -Form selbst in jedem Falle zu berechnen.

Insoweit und über — die Abhängigkeit der obigen Gleichung vorausgesetzt — für ein konstantes logarithmisches Verhältnis $\frac{n}{n'}$, d. h. für die Herabsetzung der Keimzahl auf einen bestimmten Bruchteil, z. B. die Hälfte, ein Drittel, Viertel u. s. w. ausweisen T und K einfach verkehrte Proportionalität hervorgehen mit anderen Worten: die bei verschiedenen Konzentrationen der Keimzahlen verschiedenen Absterbezahlen eines bestimmten Bruchteiles der Keime sind dann dem jeweiligen Wertepaar „*Desinfektionsgeschwindigkeitskoeffizient*“ proportional. Kennt man nun diese letzteren Werte für eine Reihe von Konzentrationen des gleichen Desinfizens, so kann aus ihrer Abhängigkeit vom Konzentrationenwerte unmittelbar auf die Abhängigkeit des Zeitwertes von der Konzentration geschlossen werden. Dieser Zusammenhang für die Absterbezeitung gleicher Bruchteile der Keimmenge — darf für die beschriebenen Konzentrationen auch als

ein solcher betrachtet werden, der für gleichresistente Keime gilt, da er ja wie oben dargelegt, ausschließlich von der Resistenzgliederung dieser einheitlichen Keimmenge abhängt. Auf diese Weise gelingt es, auf dem Umwege über die „Geschwindigkeitskonstante“ zur Feststellung der Beziehungen zwischen der Absterbedauer gleichresistenter Keime und der Konzentration oder anderweitigen Intensitäten einer Wirkung zu gelangen, was im ersten Abschnitte des Kapitels als die Grundaufgabe der Desinfektionsforschung dargelegt worden ist.

Tatsächlich ergibt sich auch die Form solcher Beziehungen bei *Chick* u. *Martin*¹, *Paul*², *Paul*, *Bierstein* u. *Reuß*^{1, 2}, ganz in gleicher Weise, wie sie oben aus der endgültigen Absterbedauer und Konzentration allein abgeleitet wurde. Die „Geschwindigkeitskonstanten“ erweisen sich als gerade proportional den Konzentrationswerten oder einfachen Potenzen dieser. Man gelangt also auf diesem Wege zu ganz analogen Resistenzgleichungen, die sich von den oben geforderten nur dadurch unterscheiden, daß sie das Absterben nicht der resistentesten, sondern anderer untereinander gleichresistenter Keime des Gemenges beschreiben. Die Resistenzkonstante der so gewonnenen Gleichungen ist immer niedriger als jene, die aus Enddesinfektionsversuchen bei gleichem Material gewonnen wurde oder zu gewinnen gewesen wäre. Für theoretische Schlüsse, die sich an die allgemeine Form der Gleichungen oder an den Wert des konstanten Exponenten knüpfen, erscheinen ja beide Arten von Gleichungen als gleichwertig. Für das häufigste Bedürfnis jedoch der Berechnung unbekannter Abtötungszeiten oder erforderlicher Konzentrationen für die Praxis sind nur solche Gleichungen verwendbar, deren Zeitwerte die endgültige, als maximal zu betrachtende Absterbedauer bedeuten. Die Gewinnung der Gleichungen über die „Geschwindigkeitskonstante“ erscheint somit als ein Umweg, u. zw. soweit die unmittelbare Feststellung der Maximalresistenz ausreichend genau möglich ist, als ein unnötiger Umweg und müßte erst noch durch die Ermittlung einer Beziehung zwischen der festgestellten Halbwert-, Drittelwert- u. s. w. Resistenz und der praktisch anzunehmenden Maximalresistenz ergänzt werden. *Gregerson* findet, daß die Feststellung der Resistenzwerte bei Endversuchen nach *Pauls* Methodik noch zuverlässig gelingt bei einer Versuchsanordnung, bei der die gewählten Überimpfungszeiten einen Fehler von einem Drittel des Abtötungszeitwertes noch störend hervortreten lassen müßten. Da *Reymann* und *Nyman* die Fehlerbreite bei der Zählmethode *Pauls* auf 46% angeben, wird man bis auf weiteres die Genauigkeit von End- und Zählversuchen als annähernd gleich anzunehmen haben.

Immerhin kann also die Methode der Verfolgung eines Desinfektionsvorganges mittels periodisch wiederholter Keimzählungen auch als ein Weg zur Lösung der beschreibenden Grundaufgabe der Desinfektionsforschung gelten, der vielleicht eine Verbesserung der Genauigkeit gestattet, die besonders bei langfristigen Versuchsanord-

nungen wünschenswert sein mag, in welchem Falle aber wohl an die Stelle der Berechnung der „Geschwindigkeitskonstante“ die Berechnung des Maximums und der Breite der Resistenzstreuung zu treten hätte.

c) Desinfektionswertberechnungen.

Die Lösung der Aufgabe, die Ergebnisse von Desinfektionsversuchen rechnerisch darzustellen, bietet die Möglichkeit auch für einen exakten Vergleich verschiedener Desinfektionswirkungen. Sobald und soweit der Verlauf der Wirkungskurven für zwei Mittel gegenüber ein und derselben Keimart feststeht, kann für jede mögliche Abtötungsdauer und für jede für den Vergleich erwünschte Konzentration und Temperatur das Verhältnis der für die gleiche Leistung erforderlichen Konzentrationen leicht berechnet werden. In der Regel wird es sich um ein bekanntes und ein unbekanntes Desinfektionsmittel handeln. Da die Desinfektion in der Praxis mehr eine Kosten- als eine Zeitfrage ist, so wird es sich empfehlen, als allgemeines Wertmaß eben den Vergleich der Konzentrationen am besten das Verhältnis der für gleiche Leistung erforderlichen Verdünnungen der beiden Mittel zu wählen, doch steht nichts im Wege, auch einen ganz entsprechenden Zeitvergleich für gleiche Konzentrationen der Mittel durchzuführen. Das Verdünnungswertmaß entspricht grundsätzlich ganz dem des *Rideal-Walker-Testes*, unterscheidet sich jedoch von ihm durch die Gültigkeit für eine bestimmte Wirkungsdauer, wie das schon *Chick* und *Martin*¹ verlangen. Der Vorteil des hier empfohlenen Vorganges gegenüber dem Vorschlage dieser Autoren, die Zeit mit 30 Minuten zu fixieren, ist der, daß aus den einmal vorliegenden beiden Gleichungen der Mittel sich das Verdünnungsverhältnis für jede beliebige Zeitdauer der Wirkung gleich leicht berechnen läßt. Am einfachsten gestaltet sich die Berechnung des Verdünnungsverhältnisses für eine bestimmte zeitliche Wirksamkeit aus der Formel $T^m \cdot P = D$, in welcher Schreibweise sich die beiden beobachteten Kurven als: 1. $T_1^{m_1} \cdot P_1 = D_1$, und 2. $T_2^{m_2} \cdot P_2 = D_2$ ergeben und somit das Verdünnungsverhältnis für gleiche Wirkung, d. h. für $T_1 = T_2 = T$, als $P_2/P_1 = T^{m_1-m_2} \cdot D_2/D_1$.

Nur wenig komplizierter gestaltet sich die Berechnung aus der allgemeinen Gleichung, wie sie praktisch für Phenole angewendet ist. Aus den beobachteten Kurven: 1. $T_1^{m_1} (P_1 - p_1) = D_1$; 2. $T_2^{m_2} (P_2 - p_2) = D_2$ ergibt sich für $T_1 = T_2 = T$ das Verdünnungsverhältnis als

$$\frac{P_2}{P_1} = \frac{\frac{D_2}{T^{m_2}} + p_2}{\frac{D_1}{T^{m_1}} + p_1} = T^{m_1-m_2} \cdot \frac{D_2}{D_1} \cdot \left(\frac{1 + p_2 \frac{T^{m_2}}{D_2}}{1 + p_1 \frac{T^{m_1}}{D_1}} \right)$$

Für die Durchrechnung konkreter Fälle empfiehlt sich die zuerst angeführte Form der Gleichung, weil hier die tatsächlichen P-Werte selbst berechnet werden, deren Verhältnis zweckmäßig auch aus der

graphischen Darstellung zu entnehmen ist. Die zweite Fassung des Ausdrucks ist nur angeführt, um zu zeigen, daß bei verschwindend kleinen p -Werten die Formel durch Wegfall des Gliedes $p \cdot T/D$ in die obige einfachere Fassung übergeht. Selbstverständlich kann das Verdünnungsverhältnis auch für zwei Mittel berechnet werden, von denen eines der einen, das andere der anderen Formel folgt, wobei eben dann nicht beide Korrekturglieder $p \cdot T/D$ verschwinden, sondern nur das im Zähler oder das im Nenner befindliche.

Es besteht so keine Schwierigkeit, jedes Mittel mit jedem beliebigen anderen zu vergleichen, wenn sich nur die Konzentrationsangaben vergleichbar, bei Lösungen am besten als Volumskonzentrationen: g/cm^3 , gestalten lassen. Es erscheint durchaus möglich, ein beliebiges Mittel, etwa das Phenol, als Maßstab aller flüssigen Desinfektionsmittel zu wählen. Vielleicht dürfte sich aber als Einheitsvergleichsmittel der Formaldehyd am besten empfehlen, weil diesem die einfachste mögliche Gleichung $T \cdot P = R = D$, also mit $p = 0$, $n = m = 1$ zukommt. Wird jedoch, wie oft verlangt wurde, als Vergleichsdesinfektionsmittel ein dem zu prüfenden wesensverwandtes gewählt, so vereinfacht sich meistens die Rechnung noch dadurch, daß sich $m_1 = m_2$ herausstellt, so daß die Wirkungskurven geometrisch ähnlich verlaufen und das Wertverhältnis, wenigstens soweit $p = 0$, einfach dem Verhältnis der Konstanten D_2 und D_1 gleich wird. Auf ein solches sicher häufiges Verhalten darf aber auch bei nahe verwandten Mitteln nicht von vornherein ohne Prüfung gerechnet werden, indem etwa von dem Vergleichsmittel nur eine Konzentration geprüft wird. Der letztere Vorgang ist nur in dem Fall statthaft, daß der Kurvenverlauf für das Vergleichsmittel ausreichend feststeht und nur die jeweilige Resistenz der Testkeime im Versuche festzustellen bleibt. Es kommen auch bei ein und demselben Mittel gegenüber denselben Keimen Verschiebungen des Exponenten mit Änderungen der Temperatur und der Lösungsgenossen vor.

Zum Schlusse seien zur Illustration des hier empfohlenen rechnerischen Vorgehens einige Beispiele solcher Berechnung gegeben. Soll die Sechsstundenwirkung der Chlorwasserstoffsäure und des Formaldehyds auf Milzbrandsporen bei 20° verglichen werden und hätte sich, bei T in Stunden bemessen, aus den Beobachtungen ergeben:

$$1. T_{HCl}^{2/3} \cdot P_{HCl} = 9,$$

$$2. T_{HCOH} \cdot P_{HCOH} = 2,$$

so ist für diesen Fall, d. h. für $T_{HCl} = T_{HCOH} = 6$ Stunden der Formaldehydindex der Chlorwasserstoffsäure

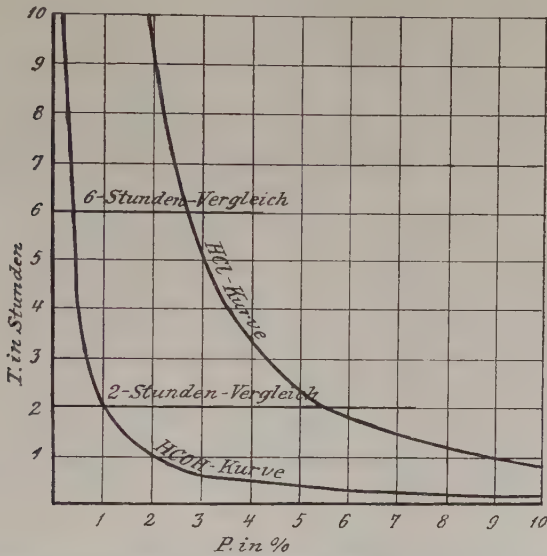
$$\frac{P_{HCOH}}{P_{HCl}} = 6^{2/3-1} \cdot \frac{2}{9} = 0.122.$$

Dies besagt, daß von HCl die mehr als 8fache Menge als von $HCOH$ für den gewünschten Desinfektionseffekt erforderlich ist. Günstiger stellt sich die Berechnung für HCl bei kürzerer, ungünstiger bei längerer Desinfektionsdauer. So wäre der Zweistundenindex als 0.176, der

24-Stundenindex als 0·077 zu berechnen, so daß dort die 5—6fache, hier die 13fache Menge an HCl als an HCOH erforderlich wäre.

Dieses Verhalten der zwei zu vergleichenden Mittel erhellt auch aus der graphischen Darstellung (Fig. 133). Die berechneten und auch alle anderen möglichen Indexwerte ergeben sich dort als das Verhältnis der Abscissen, die von den beiden zu vergleichenden Kurven auf den Parallelen zur P-Achse im Abstände T abgeschnitten werden. Konstant,

Fig. 133.



d. h. unabhängig von der Wirkungsdauer kann dieses Verhältnis nur in dem Falle sein, wenn beide Kurven einander geometrisch ähnlich verlaufen, wenn also $m_1 = m_2$ ist. Dann und nur dann ist $P_2/P_1 = D_2/D_1$ eine das Mittel charakterisierende Größe. Dies trifft etwa beim Vergleich der Formaldehydwirkung mit der eines anderen Mittels zu, das seine Wirkung ausschließlich seinem Gehalte an HCOH verdankt.

Als weiteres Beispiel sei der Vergleich der Wirkung eines Desinfektionsmittels mit der des Phenols angeführt, wenn auch das erstere einen Schwellenwert der Wirkung besitzt. Wenn die aus den Beobachtungen zu berechnende Phenolgeleichung für Staphylokokken

$$T^{1/4} \cdot (P - 0.45) = 1.46,$$

die des anderen Mittels

$$T^{1/2} \cdot (0 - 0.30) = 2.05$$

lauten würde, so folgt nach obigem der Phenolindex für Zweiminuten-wirksamkeit als

$$\frac{P_{Ph}}{P_K} = \frac{\frac{1.46}{2^{1/4}} + 0.45}{\frac{2.05}{2^{1/2}} + 0.30} = 0.96,$$

während sich für 60 Minuten 1.72, für 24 Stunden, d. h. 1440 Minuten, 2.03 ergibt.

Die mit dem Phenol zumeist verglichenen, ihm chemisch nahestehenden Mittel, gestatten aber zumeist wieder einfachere Berechnung. So kann für Kresolseifen der p-(Schwellen-)Wert als verschwindend klein und der Exponent übereinstimmend mit dem der Phenolgleichung als $m = \frac{1}{4}$ gelten. Die obige Phenolgleichung ergibt dann mit einer Kresolseifengleichung:

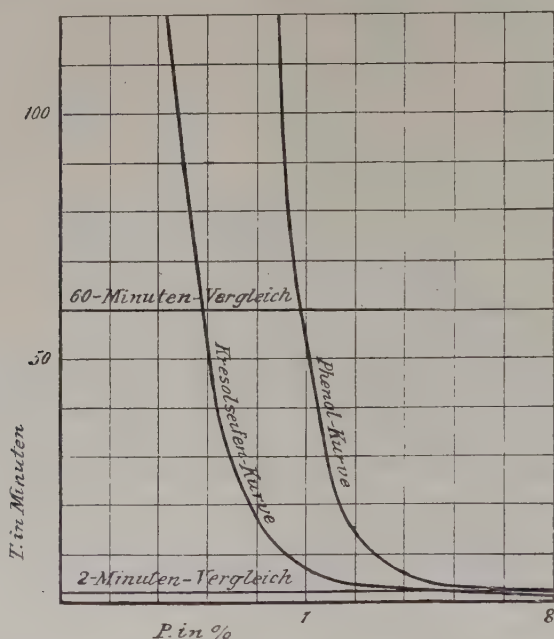
$$T^{1/4} \cdot P = 1.60,$$

den Phenolindex für 2 Minuten als

$$\frac{P_{Ph}}{P_K} = \frac{1.46 + 0.45 \cdot 2^{1/4}}{1.60} = 1.25$$

für 60 Minuten als 1.70, für 24 Stunden als 2.68 (Fig. 134). In diesem Falle sind zwar die Kurven wieder geometrisch ähnlich, doch ergibt sich

Fig. 134.



hier kein konstantes Abstandverhältnis des Punktes von der T-Achse, d. h. kein konstanter Index, weil eine Parallelverschiebung der Kurven gegeneinander vorliegt. Konstante Wertverhältnisse sind also beim Vergleich eines Mittels mit Phenol am wenigsten zu erwarten. Das Wertverhältnis zweier Mittel erscheint fast in allen Fällen als eine stetige Funktion der Abtötungsdauer, für die der Vergleich durchgeführt werden soll.

Die vorstehenden Vorschläge für die Methodik der rechnerischen Bewertung flüssiger Desinfektionsmittel wurden in den Hauptzügen vom Verfasser² zuerst

1909 gemacht. Die späteren Vorschläge *Gregersens* (1916) decken sich damit im wesentlichen. Auch *Phelps* (1911) forderte, daß die Vergleichung der Desinfektionsmittel auf die Festlegung seiner den obigen analogen Konstanten gegründet werde, doch nimmt er irrig an, daß das Verhältnis der beiden Dosis-konstanten für ein beliebiges Mittel und für Phenol einen bestimmten, das Mittel charakterisierenden Wert hätte. Naturgemäß wären jene Vorschläge ebensowohl auf Desinfektionswirkungen in Gasen und Dämpfen und auch auf solche durch Strahlungen — *mutatis mutandis* — anwendbar.

2. Methoden der Erklärung.

Als die zweite, die über die bloße Beschreibung hinausgehende Aufgabe der Desinfektionsforschung läßt sich die Erklärung der den Zell-tod bedingenden Umstände auffassen. Erst der Vergleich der physikalischen und chemischen Zustandsänderungen in der Zelle mit der Feststellung der noch oder nicht mehr erhaltenen Lebens- oder Entwicklungsfähigkeit kann, muß keineswegs, lehren, worauf die Abtötungs- oder Hemmungswirkung beruht. Solche allein als theoretische Aufklärung von Desinfektionswirkungen anzuerkennende Feststellungen sind schwierig zu erbringen, schon wegen der Mannigfaltigkeit der inneren Zellvorgänge und -zustände und unserer mangelhaften Kenntnisse derselben. Jedenfalls muß auch der entscheidende Absterbevorgang als sehr verschiedenartig, je nach der Art des Wirkenden angenommen werden. Eine für dahinzielende Untersuchungen typische Methodik kann kaum angegeben werden, doch sollen in folgendem die in der Literatur niedergelegten Versuche hierzu nach der methodischen Seite gewürdigt werden.

a) Deutung der Wirkungskurven.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Klarlegung auch dieser eigentlichen Desinfektionsvorgänge bildet die genaue Erfassung der Absterbeerscheinung eben in der Abhängigkeit der Absterbedauer von den wirkenden Außenbedingungen. Schon aus der Form der Resistenzgleichungen oder -Kurven ist es in solchen Fällen möglich, gewisse Schlüsse auf die entscheidenden Vorgänge zu ziehen.

So nähert sich bei der Desinfektionswirkung der Phenole und wahrscheinlich auch seiner Verwandten der eine Ast der hyperboloiden Kurve einer solchen Gleichung der Zeitkoordinate, wie erwähnt, bei sinkenden Konzentrationen nicht unbeschränkt; als die Asymptote dieses Astes ist also nicht die Achse selbst, sondern eine Parallele dazu in einem einer bestimmten dauernd erträglichen Konzentration entsprechenden Abstände zu betrachten, was sich in der Gleichung durch einen konstanten Abzugswert im Betrage dieser eben noch dauernd unwirksamen Grenzkonzentration vom wirkenden Konzentrationswerte aussprechen muß (*Reichel*²⁾). Dieser Sachverhalt bildet schon einen deutlichen Hinweis darauf, daß die Wirkung des Stoffes nicht auf einer chemischen Reaktion desselben beruhen kann, welche ja bei jeder geringsten Konzentration in entsprechend langer Zeit zu dem Ende der Abtötungswirkung gelangen müßte. Es folgt also im gegebenen Beispiel schon aus der Form jener Abhängigkeit, daß hier Verteilungsgleichgewichte, Lösungs- oder Adsorptionsvorgänge, mechanisch-molekulare, nicht chemisch-ionale Wirkungen vorliegen müssen.

Auch *Ikeda* hat schon im zweiten Teil seiner kurzen Schrift versucht, die Form der im ersten Teil festgestellten Resistenzkurve der Milzbrandsporen gegenüber Sublimat: $T \cdot P^{\frac{1}{4}} = R$, mit plausiblen Annahmen über die Ionenbildung des $HgCl_2$ in den wässrigen Lösungen in Beziehung zu bringen. Er nimmt dabei ohnweiters die Ionisationsgröße als dem T - und damit auch dem R -Werte einfach verkehrt proportional an und leitet dann die obige Form der Beziehung aus einer für anormale Elektrolyte häufig geltenden Dissoziationsgleichung unter der Annahme ab, daß der dissoziierte Anteil des $HgCl_2$ im Verhältnis zum nicht dissoziierten verschwindend gering sei. Eine so hypothesenreiche „Erklärung“ kann allerdings kaum als Gewinn gelten. Noch mehr gilt das für ähnliche Erklärungsversuche desselben und neuen Tatsachenmaterials, die *H. Chick*¹ aus ihrer grundsätzlich verfehlten oben genannten Gleichung ableitet.

Morawitz und *Freundlich* kommen, wie erwähnt, 1910, ebenfalls auf den Versuchsdaten von *Kroenig* und *Paul*² fußend, zur selben Resistenzgleichung wie *Ikeda* und glauben daraus auf Adsorption des $HgCl_2$ an der Oberfläche der Keime schließen zu können, wie das schon vor ihnen *Wo. Ostwald*² für die Salzgiftwirkung auf Gammarsukrebse auf Grund analoger Gleichungen tun zu können glaubte. Ebenso schließen *Paul*, *Bierstein* und *Reuß*¹ 1910 aus der für die Wirkung des Sauerstoffes auf Staphylokokken gefundenen Beziehung: $T \cdot P^{0.5} = R$, daß hier entweder nicht das O_2 -Molekül, sondern das O -Ion zur Geltung komme, oder aber O_2 -Adsorption an der Bakterienoberfläche ins Spiel trete. Dieselben Autoren² wollten dann auch mit gleichen Argumenten die der obigen Formel gleiche, für sehr verdünnte HCl -Lösungen gefundene Wirkungskurve durch Adsorption erklären, obwohl sie selbst hervorheben, daß HCl wenig adsorbiert werde; sie stellen auch mit Verwunderung fest, daß für die wahrscheinlich stärker adsorbierbaren Säuren: Essig- und Buttersäure die Gleichungen $T \cdot P = R$ und $T \cdot P^2 = R$ gelten (S. 247), die ja zur Adsorptionsvorstellung nicht passen, weil hier $n = 1$ oder größer ist.

Allen diesen Erklärungsversuchen durch Ionisation und Adsorption liegt die unerwiesene und zumeist stillschweigend gemachte Annahme zugrunde, daß die Dauer des bis zum Zelltode führenden Prozesses selbst der eigentlich wirk-samen Konzentration, sei es der Ionen, sei es der die Keime einhüllenden Moleküle einfach verkehrt proportional sein müsse. *Wo. Ostwald*², dem darin auch *Dernoschek*, *Hartmann* u. a. folgen, definiert demgemäß kurzweg als „Giftigkeit“ den reziproken Wert der Absterbedauer: $1/T$. Von *Paul* und seinen Mitarbeitern wird allerdings die einfache verkehrte Proportionalität zwischen der Absterbedauer und der Konstante des der Überlebenszahl proportionalen Absterbeverlaufes bewiesen, welche Zahl jedoch, wie oben dargetan, nicht als Maß der tödlichen Giftwirkung gelten darf.

Gegenbauer und *Reichel* haben die für Milzbrand und HCl gefundene Gleichung $T \cdot P^n = R$, deren Exponent je nach Umständen Werte zwischen 1 und 2 annimmt, dadurch zu erklären versucht, daß die HCl -Konzentration der Lösung offenbar für die Geschwindigkeit sowohl des Diffusionsprozesses in die Zelle, als auch der im Zelleibe stattfindenden hydrolytischen Eiweißspaltung einfach proportional sein muß. Für beide Arten von Vorgängen steht ja der logarithmische Ablauf fest. Je nachdem nun die Dauer des Diffusionsprozesses neben der des Spaltungsprozesses mehr oder weniger in Betracht kommt, was hier offenbar wesentlich durch Temperaturen und Lösungs-genossen bestimmt wird, wofür aber bei organischen Säuren auch die Molekulargröße und vielleicht auch Adsorptionsprozesse maßgebend sein mögen, muß sich der Exponent von 1 auf 2 verschieben. Aus seiner Höhe kann also für bestimmte Anordnungen auf die verhältnismäßige Teilnahme der beiden Vorgänge am Zustandekommen der Wirkungskdauer geschlossen werden.

Endlich hat *Gegenbauer*² für die Wirkung des Sublimates gegen Milzbrandsporen mit einer im Vergleiche zu *Kroenig*² und *Pauls* Versuchen nach dem Vor-

gange *Ottolenghis*^{2,3} wesentlich verbesserten Methodik die wahre Absterbedauer als unabhängig von der HgCl_2 -Konzentration oberhalb einer bestimmten Grenze gefunden, was der vereinfachten Gleichung $T = R$ entspricht, und woraus er mit Recht folgert, daß das Absterben hier durch die bestimmte längere Dauer des Bestehens der Sublimatweißverbindung, nicht schon durch das bloße Zustandekommen desselben bedingt sei. Die mit der Konzentration variable Dauer der Entstehung der Verbindung verschwindet hier neben der zum endgültigen Tode erforderlichen Zeit. Ein Gleiches gilt auch schon für die Erreichung eines relativen Todes, d. h. eines Zustandes der Entwicklungsunfähigkeit, dem durch bloßes Waschen der Keime nicht mehr abzuhelfen ist. Diese, der endgültigen Absterbedauer gegenüber weit kürzere — aber immer noch lange — Zeit hängt anscheinend ebensowenig wie jene von der HgCl_2 -Konzentration der Lösung ab, ist also auch schon nur mehr durch die Größe der Bindung, nicht mehr durch die Geschwindigkeit ihres Zustandekommens bestimmt.

Das gleiche findet *Gegenbauer*² bei Staphylokokken für die Erreichung des Scheintodes, während sich aber hier das endgültige, durchwegs auch wieder viel später eintretende Absterben als abhängig von der HgCl_2 -Konzentration der Lösung, u. zw. nach der Beziehung $T \cdot P^{0.5} = R$ erweist. Daraus wird geschlossen, daß hier die Dauer des Bestandes der offenbar schon zur Zeit des Scheintodeintrittes längst vollzogenen chemischen Bindung nicht allein als Todesursache betrachtet werden kann, sondern daß auch der im Zellkörper gelösten, der Außenkonzentration als proportional erwiesenen HgCl_2 -Menge mindestens ein Teil der tötenden Wirkung zukommt.

b) Temperatureinfluß.

Zu den Methoden der Erforschung der Entkeimungswirkung ist ferner alles zu zählen, was auf eine planmäßige Variation der Bedingungen von Desinfektions- und Hemmungsversuchen unter strenger Wahrung der Vergleichbarkeit hinausläuft, wodurch eben nicht bloß die zweckmäßigsten Bedingungen für die praktische Anwendung gefunden, sondern auch vielfach die Wirkungen selbst ursächlich aufgeklärt werden können. Variiert wird vor allem die Temperatur.

Angaben über ihren Einfluß auf chemische Giftwirkungen für Bakterien finden sich schon bei *Koch*¹ (1881), *Nocht* (1889) und *v. Behring*³ (1890). Nach letzterem wird der Tötungswert der Konzentration eines Mittels im allgemeinen mit erhöhter Temperatur immer niedriger, während der Hemmungswert beim Entwicklungsoptimum am größten zu sein pflegt. *Brooks* hat später ähnliches gefunden; nach *H. Chick*⁴ (S. 154) scheint nicht bloß für hemmende, sondern auch schon für langsam tötende Konzentrationen zu gelten, daß sie unterhalb des Entwicklungsoptimums des Keimes stärker als in dessen Nähe wirken. Systematische Beobachtungen über den Temperatureinfluß auf die Desinfektion in Lösungen bringt zuerst 1891/92 *Heider*^{1,2}; auch *Henle* macht 1892 einschlägige Angaben; nach *Vrijheid* (1896) ist die Wirksamkeit der Mittel am größten bei der Auskeimungstemperatur. *Madsen* und *Nyman* berechnen als erste den Temperatureinfluß auf die Abtötungszeit als übereinstimmend mit den bekannten Temperaturkoeffizienten von 2—3 für 10° C bei chemischen Reaktionen. *H. Chick*² gibt zahlreiche exakte Versuche und Berechnungen zu dieser Frage, wobei sie jenen Koeffizienten häufig auch wesentlich höher, selbst bis zu 14 findet. Aus den Angaben bei *Gegenbauer* und *Reichel*¹ berechnet sich der Koeffizient auf etwa 3. *Croner* glaubt 1912, wohl mit Unrecht, gegen die Berechnungen von *Madsen* und *Nyman* Tatsachen geltend machen zu können, die sich im wesentlichen mit dem decken, was schon *v. Behring*³, wie oben angeführt, über den Temperatureinfluß

feststellte. Temperatureinflüsse auf Desinfektionswirkungen behandeln auch *Zehl* (1908) und *Hartmann* (1918).

Bei reinen Wasser- und Wasserdampfphasen, ebenso in Luft, wird häufig die Temperatur als die hauptsächlich wirksame Intensität schlechtweg aufgefaßt, doch dürfte ihre Wirkung auch hier keine grundsätzlich andere als eine Reaktionsbeschleunigung chemischer Sauerstoff- und Wasserwirkungen sein.

Bedeutende Forschungen finden sich über das Absterben in Luft bei *Koch* und *Wolffhügel* (1881), *Schumburg* (1902), *Fischer*¹ (1907), *Ballner*³ (1907) und *Xyländer* (1908), *Paul*² und *Paul*, *Bierstein* und *Reuß*¹ (1910); ferner über das Absterben in Dampf und Wasser bei *Koch*, *Gaffky* und *Löffler* (1881), *Sambuc* (1885), *Globig* (1888), *Gruber*^{1, 2} (1888), *Teuscher* (1890), *Budde* (1891), *Forster*^{1, 2} (1892/93), *Christen* (1895), *Ficker*² (1898), *Rubner*^{1, 5} (1895—1899), *Schut* und *Eijkmann*¹ (1903), *H. Chick*² (1910); eine ausführliche und kritische Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich bei *Graßberger*¹ (S. 24—58).

Die Methodik dieser Autoren wurde zum Teil schon im vorigen Kapitel bei der Beschreibung der Expositionsarten dargelegt. Eine mathematische Präzisierung der Ergebnisse steht hier im allgemeinen noch aus.

Der Temperatureinfluß bei Strahlungswirkungen kommt zumeist als störende Nebenwirkung in Frage. Alle Autoren sind darin einig, daß die bactericide Lichtwirkung nicht aus der nebenherlaufenden Erwärmung erklärt werden könne; die einen glauben jedoch, daß die Lichtwirkung bei höheren Temperaturen auch wesentlich schneller zustande komme, andere halten sie für weitgehend unabhängig von der Temperatur. Den letzteren Standpunkt vertreten zuletzt *Henry-Cernovodeanu* und *Henry*.

c) Lösungsgefüge.

Variiert wird ferner das Gefüge der wirkenden Lösungen. Die Variation der Konzentrationen des wirksamen Stoffes wurde im ersten Abschnitte des Kapitels bei Beschreibung der Gewinnung der Wirkungskurven erörtert.

Paul und seine Mitarbeiter haben die Forderung erhoben, die Konzentrationsangaben, wenigstens für theoretische Untersuchungen nach der in der physikalischen Chemie üblichen Schreibweise zu machen, d. h. jedesmal die Literzahl zu nennen, in der ein Grammolekül der wirkenden Substanz enthalten ist. Solche Angaben gestalten sich jedoch schleppend und minder übersichtlich als die der ihnen reziproken prozentischen Konzentrationszahlen, aus denen ja die Normalwerte jederzeit berechnet werden können: auch können oft Zweifel über die Molekulargröße bestehen und viele Desinfizienzien sind überhaupt nicht chemisch reine Stoffe, sondern Gemische mehrerer oder vieler. Von den gleichen Autoren wurde auch verlangt, daß Vergleiche der Wirkung verschiedener Substanzen nur für äquimolekulare oder isohydrische Lösungen anzustellen seien. Solche Vergleiche sind zweifellos von größtem Interesse für die Erklärung der Giftwirkung, insbesondere für Stoffe ähnlichen Baues und demgemäß verwandter Wirkungsweise (*Bechold* und *Ehrlich*) oder bei osmotischen Giftwirkungen (*Křiženecky*); leider fehlen sie bei *Laubenheimer*¹, wo allerdings vielfach der Vergleich von Isomeren auch bei Prozentangaben die molekulare Wirkungsstärke hervortreten läßt. Für das praktische Bedürfnis des Kostenvergleiches bei Anwendung ver-

schiedener Mittel erscheint es jedoch als durchaus zulässig, auch beliebige andere Konzentrationsangaben zu vergleichen. *Pulst* wollte auch für den Vergleich verschiedener Konzentrationen eines Stoffes gleichen osmotischen Druck durch Zufügen indifferenten Salze anstreben, was jedoch nicht angeht, weil Lösungs- genossen als solche niemals indifferent sind, sondern die Wirksamkeiten der Hauptstoffe immer beeinflussen.

Fast alle Lösungs-genossen beeinflussen die keimfeindliche Wirkung. Im einfachsten Falle geschieht dies durch Mitwirksamkeit bei der Kombination mehrerer Giftstoffe in einer Lösung.

Rotter versuchte schon 1888 durch Häufung zahlreicher für sich unwirksamer Giftkonzentrationen zu einer Addition der Wirkungen zu gelangen. Mit *Nochts* Arbeit (1889) beginnt eine Reihe von Untersuchungen über die Kombination der Seifenwirkung mit der anderer chemischer Desinfektionsmittel. *Henle* analysiert 1882 die Wirkung der Kreoline und glaubt sie aus den Wirkungen der Bestandteile erklären zu können. *Rasp* (1907) und *Frei* (1914), der das ganze Problem der Kombinationswirkungen aufrollt, beschäftigen sich wieder vorwiegend mit Seifenkombinationen. Auch *Eisenberg* und *Okolska* wollen 1913 als „synergetische“ Wirkungen die kombinierten Giftwirkungen mit den Wirkungsverschiebungen durch Veränderungen des Lösungsgebietes zusammenfassen. Sie bringen eine große Fülle von Beobachtungen auf beiden Gebieten, leider mit einer wenig exakten Anordnung ihrer Desinfektionsversuche.

Verstärkende und abschwächende Wirkungen an sich indifferenter Lösungs-genossen finden ihre Erklärung teils durch einen von ihnen ausgeübten Einfluß auf den Lösungszustand des Giftes, besonders auf die hydrolytische (*Reichenbach*²) und elektrolytische (s. unten) Dissoziation der wirksamen Stoffe, teils durch Beeinflussung ihrer Löslichkeit oder ihres Haftdruckes, wodurch die Bedingungen ihrer Verteilung zwischen Flüssigkeit und Keimen (*Spiro*, *Traube*, *Reichel*²) verschoben werden. Schutzwirkungen kommen, besonders durch Eiweißkörper aber auch durch alle anderen mit dem Desinfiziens reaktionsfähigen Stoffe auf dem Wege seiner vollständigen oder teilweisen Bindung (*Pitzmann*, *Groß*²) oder auch dadurch zustande, daß eine Fällung der Schutzstoffe durch das Desinfiziens die Keime mechanisch vor der raschen Berührung mit diesen schützt oder sie ihm auch dauernd entzieht. Zur Verhinderung solcher die Desinfektionswirkung störender Niederschläge wurde für Sublimatlösungen schon 1887 von *Liebreich* der Zusatz von Kochsalz, durch *Laplace* der von Weinsäure vorgeschlagen.

Von größter Bedeutung für die Wirkung der Desinfizienzen ist das Lösungsmittel selbst. Das war schon von *Koch*¹ 1881 erkannt worden, der die geringe Wirksamkeit nichtwässriger, z. B. alkoholischer und besonders öligter Lösungen im Vergleiche mit wässrigen Lösungen feststellte, was dann 1903 durch *Ceppi* und durch *Lenti*, für Salben schon 1889 durch *Gottstein* und 1895 durch *Breslauer*, für Glycerin 1900 durch *v. Wunschheim* bestätigt wurde, während *Engels* 1903 und neuerdings auch *Wilpert* 1916 für alkoholische Lösungen gegenteilige Befunde bringen, die sich wohl aus der Gegenwart von Wasser und damit aus der Mitwirksamkeit des Alkohols als Desinfiziens erklären lassen dürften. Über die Wirksamkeit des Alkohols in Kombination mit Wasser liegen viele Untersuchungen vor (s. *Beyer*). Die von *Gottstein* und von *Breslauer* festgestellten Ausnahmen für Lanolin als einer Salbengrundlage, die noch nennenswerte Desinfektionswirkungen zuläßt, beruhen offenbar auf dem Charakter dieses Stoffes als einer zweiphasigen Emulsion.

Der Parallelismus der antibakteriellen Wirkung der Schwermetallsalze mit ihrer Ionenkonzentration wurde, nachdem schon *Dreser* 1893 die Hg-Salzhemmung als von der Dissoziationsgröße abhängig gefunden hatte, gleichzeitig und unabhängig einerseits von *Kroenig* und *Paul*, anderseits von *Scheurlen* und *Spiro* durch die Feststellung erwiesen, daß die für die Ionisationsgröße als einflußreich bekannten Verschiebungen des Lösungsgefüges immer auch die Desinfektionswirkung gleichsinnig beeinflussen.

Iheda versuchte, wie erwähnt ohne volle Beweiskraft seiner Argumente, zu zeigen, daß auch ein quantitativer Parallelismus beider Zustände wenigstens glaubhaft sei. Der analoge Versuch *H. Chicks*¹ (S. 128) wirkt kaum überzeugender (s. oben dieses Kapitel). *Scheurlen* und *Spiro* finden die Hemmungswirkung mancher komplexer, aber wenig dissoziierter Schwermetallsalze stärker als die einfacher Salze, wofür auch schon *v. Behring*³ Beobachtungen beibringt. *Maillard* fand die Behinderung des Wachstums von Schimmelpilzkulturen durch Cu-Salze vom Cu-Ionengehalte der Lösung abhängig.

Auch für Säuren wurde der elektrolytische Dissoziationszustand in seinem Verhältnis zur bactericiden Wirkung mehrfach untersucht und zum Teil auch als maßgebend befunden: *v. Behring*³ vermutet eine solche Beziehung; *Clark* vergleicht die Wirkung der Säuren mit der ihrer Salze, *Bial* findet eine Abhängigkeit der Behinderung der Hefegärung von der Ionisation der Säuren; *Paul*, *Bierstein* und *Reuß*² studieren eingehend die bactericiden Wirkungen verschiedener Säuren, *Gegenbauer* und *Reichel* die der Salzsäuren auf Milzbrandsporen, und alle genannten Autoren gelangen dazu, die Ionen als jenes Prinzip zu betrachten, dem die Wirkung in der Hauptsache zuzuschreiben ist. Ähnliches dürfte für Laugen und Oxydationsmittel (*Paul*²) gelten.

In allen Fällen, wo Ionen als wirksam befunden werden, handelt es sich entweder um echte chemische Reaktionen dieser mit dem lebenden Protoplasma, dessen Reaktionsfähigkeit schon *Loewe* schlechtweg als die Voraussetzung jeder Zellgiftwirkung annimmt, oder aber um katalytische Wirkungen der Ionen auf andere Reaktionen.

Chemische Reaktionen zwischen Schwermetallen und Zelleiweiß beweisen *Mann* für Hefe mit HgCl_2 , *Pitzmann* für Bakterien für HgCl_2 und AgNO_3 . *Gegenbauer* verfolgt die HgCl_2 -Bindung quantitativ; es wird dabei nicht bloß das Hg, sondern auch das Cl des Moleküls, wahrscheinlich als HCl in fixer Proportion an das Eiweiß gebunden. *Friedberger* und *Joachimoglu* finden eine Abhängigkeit der Desinfektionswirkung von der Valenzstufe der Elemente.

Für das Zustandekommen sowohl solcher chemischer Reaktionen, als auch für jede andere Wirkungsart von Desinfizienzien auf das Plasma der Keime ist die chemische Konstitution der wirksamen Stoffe entscheidend.

Vergleiche für nahverwandte Desinfektionsmittel bringen: *Reichenbach*², *Wirgin*, *Morgenroth*, *Schöller* und *Schraut*, *Bechold* und *Ehrlich*, *Bechold*^{3, 5} und *Laubenheimer*⁴. Auf eigenartige Weise will *Regenstein* ermitteln, ob zwei verwandte chemische Stoffe in gleicher oder anderer Art auf die Keime wirken: er gewöhnt diese an den einen Stoff und untersucht dann ihr Verhalten zu dem andern. So sollen phenolgewöhnte Staphylokokken zwar gegen Kresole nicht, aber gegen Hydrochinon und Brenzkatechin resistenter geworden sein.

Die katalytischen Reaktionsbeschleunigungen sind wenig eingehend studiert.

Sie werden meist dann zur Erklärung herangezogen, wenn die Beobachtungen mit der Theorie der Ionenwirksamkeit in Widerspruch zu stehen scheinen, so bei *Clark*, *Noyes*, *Paul*, *Bierstein* und *Reuß*². Solche Widersprüche können aber, worauf *Höber* 1902 hingewiesen hat, auch durch die Verhältnisse der Diffusion aus der Lösung in die Zelle hinein zustande kommen, wo ja erst die entscheidenden Konzentrationen auftreten müssen. Die durch *Gegenbauer* und *Reichel* (S. 56 und 92) entwickelte hypothetische Erklärung der Salzsäurewirkung auf Milzbrandsporen nimmt auf die Unterschiede der Diffusibilität der Zellwände für die einzelnen Ionenarten Rücksicht und kann dadurch auf die Annahme einer Neutralsalzionskatalyse verzichten.

d) Phasengleichgewichte.

Wie schon in den zuletzt genannten Fällen, knüpfen sich überhaupt die brauchbarsten Erklärungsversuche der Abtötungsvorgänge durch Zellgifte an die Vorstellung der in den Keimen den Lösungen gegenüber ja offenbar vorliegenden *heterogenen Systeme*.

Die erste auf *Kochs* Anregung zurückgehende Arbeit über Verteilungsvorgänge von Desinfizienzien zwischen verschiedenen Lösungsmitteln von *Wolffhügel* und *v. Knorre* zeitigte zwar noch kaum verwertbare Ergebnisse. In der Folge tritt vielfach die Vorstellung auf, daß die Desinfektionswirkung als eine Koagulation des Eiweißes der Keime, also die Verdrängung der Körperstoffe aus der Wasserphase aufzufassen sei. *Lewith* und schon früher *Haas* hatten gezeigt, daß wasserfreies Eiweiß nicht koagulationsfähig sei. Dies schien eine mit der Koagulationstheorie der Desinfektionswirkung übereinstimmende Erklärung für den Schutz zu bieten, den trockene Keime vor der Hitzeeinwirkung und auch vor Giftwirkungen (*Sitsen*) genießen. *Weyland* (1897) und *C. Römer* (1898) vertreten diese Anschauung, die sich aber in der Folge als unhaltbar erwies, weil viele Desinfektionswirkungen ohne Koagulation einhergehen und auch die Fällung der Eiweißkörper nicht als einheitlicher Prozeß, sondern als Folgezustand sehr verschiedener Veränderungen aufzufassen ist. Die Vorstellung einer Verdrängung der Keimeiweißstoffe aus der Wasserphase ist aber auch für das Verständnis der Desinfektionsvorgänge unnötig und irreführend, weil diese Stoffe auch in unkoagulierte Zustand schon eine zweite Phase, oder richtiger ein System von nichtwässrigen Phasen der wässrigen Flüssigkeit gegenüber bilden.

Die entscheidenden physikalisch-chemischen Denk- und Arbeitsmethoden erscheinen auf dieses Gebiet zum erstenmal angewendet in der auch für viele andere Gebiete der Medizin grundlegenden Schrift *Spiros* über physikalische und physiologische Selektion. Schon in der vorangehenden Arbeit von *Scheurlen* und *Spiro* war die klare Unterscheidung der Desinfizienzien „erster und zweiter Ordnung“, d. h. der echt chemisch, durch Ionenreaktionen und der durch mechanische Affinitäten, in der Hauptsache durch Löslichkeiten und Oberflächenkräfte wirksamen Stoffe getroffen worden. Hier wird die Lösungsverteilung nach dem *Henryschen* Gesetz zur Erklärung des Lösungsmiteleinflusses auf die Desinfektionswirkung und die selektive Speicherung der wirksamen Stoffe in der Zelle herangezogen und die später von *Spiro* und *Bruns* noch gestützte Einreihung des von *Scheurlen* entdeckten Phänomens: Steigerung der Phenolwirkung durch Kochsalz, unter die sog. Aussalzvorgänge unternommen, d. h. ihre Erklärung aus der gesetzmäßigen Verschiebung der Löslichkeitsgrenzen durch die Lösungsgenossen und die sich daraus für die Verteilung des Lösungssstoffes zwischen zwei Phasen ergebenden Folgerungen. Damit war an dem Beispiel des Phenols, das ja als Typus der größten und in vieler Hinsicht wichtigsten Gruppe der Desinfizienzien gelten darf, das dort nicht chemisch-ionale, vielmehr mechanisch-molekulare Zustandekommen der Abtötungswirkung dargetan, welche Vorstellung durch die eingehenden quantitativen Untersuchungen *Reichels*², der die auftreten-

den Teilungsfaktoren und Löslichkeitsverschiebungen für die in Betracht kommenden Phasen messend bestimmte und mit den aus den Wirkungskurven ableitbaren Resistenzkonstanten in gutem Einklange fand, zu bestätigen war.

Im Jahre 1899 war durch *Overton* und durch *H. H. Mayer* dargetan worden, daß auch die narkotische Wirksamkeit mancher Stoffe mit ihrem Verteilungsfaktor zwischen wässrigen und öligen Phasen parallel gehe. Die dann besonders von *Höber* mit Recht betonte Bedeutung der spezifischen Permeabilität der Plasmagrenzschichte für die Gifte wurde dann vielfach so verstanden, als ob eine ölige, lipoide Zellhülle allgemein das Zustandekommen der Giftwirkungen vermitteln müsse. *Reichel*² konnte zeigen, daß auch die Annahme eiweißartiger Zellhüllen das Phänomen der selektiven Permeabilität erklären könne, wie auch von anderen Autoren angenommen wird (s. *Höber*, 4. Aufl., S. 412).

An die Vorstellung der selektiven Wirksamkeit durch Lösungsverteilung oder die Annahme spezifischer Lösungsaffinitäten zwischen bestimmten Keimen und bestimmten Desinfektionsmitteln knüpfen in der Folge zahlreiche Arbeiten, besonders auch solche, die sich mit Fragen der inneren Desinfektion befassen, an, so *Bokorny*, *Jodlbauer* und *Tappeiner*, *Bechold*^{2, 4} und *Eisenberg*^{2, 3}.

Es handelt sich im wesentlichen um die Feststellung, welche Quantitäten des desinfizierenden Stoffes von der Gewichts- oder auch von der Volumseinheit der als heterogenes System betrachteten Keime oder Phasen des Zelleibes bei verschiedenen Konzentrationen der als „Flotte“ dienenden Lösung an Desinfiziens und Lösungsgeossen bei festliegender Temperatur gebunden werden. Nur aus den quantitativen Verhältnissen und der Reversibilität kann auf die Art der Bindung geschlossen werden. Eine irreversible chemische Verankerung des Desinfiziens in der Zelle muß sich in einer Unabhängigkeit der Bindungsgröße für die Gewichtseinheit der Zellphase von der Flottenkonzentration aussprechen, soweit wenigstens die absolute Menge des anwesenden Giftes zur chemischen Sättigung der Zellphase ausreicht. Eine Abhängigkeit der reversibeln Giftbindung von der Flottenkonzentration kann durch Lösungsverteilung oder durch Adsorption bedingt sein. Ein konstanter Teilungsfaktor: $P/P' = K$ spricht für Lösungsverteilung, wobei aber genau genommen beide Konzentrationen als Volumsprozente g/cm^3 auszudrücken wären, was für die Zellphasen oft schwer zu erfüllen ist. Aber auch Abweichungen von dieser einfachsten Form des Verteilungssatzes kommen bei echter Lösungsverteilung zustande, wenn der molekulare Zustand des Giftes in beiden Phasen nicht derselbe ist. Die Gleichung lautet dann: $P/P'^n = K$, worin n das Verhältnis der Molekulargrößen in beiden Phasen bedeutet. Die gleiche Formel gilt aber auch für Adsorptionsverteilung, wobei nur n , der Adsorptionskoeffizient, kleiner als 1 zu sein pflegt. Eine mit der Giftkonzentration fallende relative Giftbindung, die für die Annahme von Adsorptionswirkungen zu verlangen ist, beweist also noch nicht, daß wirklich Adsorption vorliege. Durch das gleichzeitige Spiel von chemischer Bindung, Absorption und Adsorption komplizieren sich die tatsächlichen Verhältnisse und ihre Erforschung.

Um bei solchen Untersuchungen zu ausreichend genauen Analysenwerten zu gelangen, ist es erforderlich, die den Zelleib bildenden oder

repräsentierenden Phasen in einer solchen Masse ins Spiel zu bringen, daß die in diese Phase übertretende Menge des Desinfiziens von gleicher Größenordnung wie die in der Lösung zurückbleibende sei, wenigstens dann, wenn die erstere Menge als Differenz der gesamten und der letzteren gemessen wird.

Die Nichtbeachtung dieses Grundsatzes führte in der Folge zu verwirrenden Angaben. *Herzog* und *Betzel*¹ wollten zunächst bei Schütteln von 5 g Hefe (1.3 g Trockensubstanz) mit 100 cm³ Phenollösung nach Abzentrifugieren gar keinen Phenolverlust an der Hefe festgestellt haben. In der ausführlicheren Veröffentlichung² wird aber für Versuche mit 10 g Hefe auf 100 cm³ doch ein solcher Verlust als Differenz zweier viel größerer Werte berechnet. Die Verlustzahlen sind demgemäß äußerst schwankend, doch im Durchschnitt von ähnlicher Größenordnung, wie in *Reichels*² Versuchen mit Öl und koaguliertem Eiweiß. Die Autoren berechnen dann unter willkürlicher Ausschaltung der bei höheren Konzentrationen gewonnenen Werte, und unter manchen Vernachlässigungen, die angesichts der schwankenden Werte allerdings berechtigt erscheinen, eine Verteilung des Phenols, die sich auch wirklich als nahezu konstant erweist, indem sich im Mittel das Verhältnis $P/P'^{0.9} = K$, als gültig herausstellt. Die kleine Abweichung vom *Henryschen* Gesetz der Lösungsvorstellung: $P/P' = K$, in dem von 1 etwas abweichenden Exponenten 0.9 beweist natürlich unter solchen Umständen gar nichts, zumal die Autoren selbst in der gleichen Arbeit zwei für Chloroformverteilung gefundene solche Exponenten: 1.15 und 1.53 als „geringe Schwankungen“ bezeichnen. Trotzdem schließen die Autoren aus jenem Exponenten 0.9 auf Adsorption, also auf die Anhäufung des Phenols um die Keime durch Oberflächenkräfte. Ihr ganzer Versuchsbereich liegt unter 2% Phenol, und alle Versuche mit mehr als 2% Phenol sind aus der Rechnung weggelassen, weil sie die Zahl n über 1 bringen würden, was bei Adsorption eben nicht sein darf. *Reichels* Versuche² erstrecken sich bis mehr als 5% Phenol und er hat schon darauf hingewiesen, daß sich der Teilungsfaktor bis zu 2% noch zugunsten des Zelleibes mit steigender Flottenkonzentration erhöht, welcher Vorgang offenbar die mögliche Wirkung von Adsorptionsvorgängen in diesem Konzentrationsbereiche überwiegen und verdecken müßte. Die Erscheinung wurde dort durch den Nachweis fortschreitenden Wasserverlustes der Eiweißphasen, womit ihre Lösbarkeit für Phenol tatsächlich ansteigt, auch aufgeklärt.

Küster und seine Mitarbeiter *Ernst Mayer*, *Bojakowsky*, *Rothaub* bringen gleiche Volumina „dichter“ Bakteriensuspensionen mit 1—3%iger Phenollösung zusammen und wollen aus der Phenolabnahme im Filtrat, u. zw. durch Asbestfilter, die mit einer „gleichen“ Phenollösung vorgetränkt werden, die Phenolbindung durch die Keime messen. Das Verhältnis Trockensubstanz : Flotte ist hier nicht berechenbar, liegt aber offenbar noch niedriger als in den Versuchen von *Herzog* und *Betzel*^{1,2}. Die Verlustwerte sind, wie nicht anders zu erwarten, sehr klein und schwankend. Trotzdem werden auch hier wieder aus einer geringen durchschnittlichen Disproportionalität des Verlustes mit der Keimmenge weittragende Schlüsse in der Richtung auf Adsorption oder gar auf chemische Bindung des Phenols am Zelleib gezogen. Auch die höchst überraschende und mit allen sonstigen Erfahrungen im Widerspruch befindliche Behauptung dieser Autoren, daß das gebundene Phenol nach dem Tode der Keime wieder frei werde, beruht nur auf ganz wenigen, kleinen und sehr schwankenden Einzelwerten. Eine ausführliche Kritik der Arbeiten der *Küsterschen* Schule findet sich bei *Eisenberg* und *Okolska*, die zutreffendere Schlüsse aus ähnlichen Versuchen ableiten, deren Anordnung jedoch auch nicht genug exakt erscheint, um beweiskräftig zu sein.

Kaum besser als mit jenen das Phenol betreffenden Angaben steht es mit anderen Behauptungen über den Nachweis von Adsorptionserscheinungen für Desinfektionsmittel an Keimen und anderen Organismen. Wie wenig beweisend

die auf Neutralsalz, HgCl_2 -, Sauerstoff- und Säureadsorption bezüglichen Schlüsse von *Wo. Ostwald*², *Morawitz* und *Freundlich*, *Paul*, *Bierstein* und *Reuß*^{1, 2} sind, wurde schon oben dargetan. Aber auch was *Herzog* und *Betzel*^{1, 2} für eine Chloroformadsorption mit gleicher Versuchsanordnung wie bei den Phenolversuchen beibringen, beweist eine solche keineswegs, da der Teilungsfaktor sich mit steigender CCl_4H -Konzentration der Flotte zugunsten der Keime verschiebt. Offenbar findet hier durch das CCl_4H eine ähnliche Wasserverdrängung aus der Eiweißphase statt wie durch Phenol, wodurch das Lösungsvermögen ansteigt. Adsorptionserscheinungen können neben einem solchen Vorgang zwar nicht ausgeschlossen, aber auch schwerlich nachgewiesen werden.

Aber auch der Nachweis der sog. „Adsorptionsisotherme“, d. h. eben einer Verschiebung des Teilungsfaktors mit steigender Flottenkonzentration zu ungunsten des Zelleibes, wie ihn diese Autoren für AgNO_3 und HgCl_2 mit ihrer Methodik erbringen, bildet keinen Beweis für Adsorptionsvorgänge. *Procter* sowie *Reichel* und *Gegenbauer* (S. 87 ff.) haben darauf hingewiesen, daß die HCl -Bindung an Gelatine und andere Proteide jene Abhängigkeit zeigt, ohne auf Adsorption zu beruhen, u. zw. infolge der verfehlten Zusammenrechnung der wirklich gebundenen und der im Quellungswasser befindlichen Säuremengen. *Gegenbauer*² hat dann kürzlich für die HgCl_2 -Proteinbindung mit koagulierte Eiweiß und auch Hefe durch umfangreiche und exakte Versuche ein ähnliches Verhalten nachweisen können, indem einerseits eine den Proteinmengen proportionale konstante Bindung erfolgt, anderseits eine Lösungsverteilung des HgCl_2 zwischen Flotte und Proteinphase sehr zugunsten der letzteren stattfindet. Die Versuche gestatten, den Teilungsfaktor als konstant zu betrachten, so daß trotz „Adsorptionsisotherme“ bei Berechnung des gesamten an das Eiweiß gebundenen HgCl_2 auch hier keine Adsorption nachgewiesen ist. Die gleiche Erscheinung beim AgNO_3 dürfte sich ganz ebenso erklären. *Herzog* und *Betzel*² bringen zwar für diesen Stoff und für HgCl_2 je einen Versuch bei, der die Beweglichkeit des Gleichgewichtes und damit den Adsorptionscharakter beweisen soll, doch wird dort nur gezeigt, daß sich der — annähernd — gleiche Endzustand der Verteilung auf verschiedenem Wege erreichen lasse. Nur Reversibilitätsversuche mit stark überschüssiger Flotte könnten beweisen, ob wirklich alles an die Eiweißphasen geknüpfte Desinfiziens dort bloß — sei es gelöst, sei es adsorbiert — verteilt, oder ob ein Teil chemisch gebunden ist. *Gegenbauers*² Versuche mit achttägiger Dialyse des HgCl_2 -Proteins gegen fließendes Wasser beweisen das letztere, so daß nur für den Differenzwert zwischen Gesamtbindung und chemischer Bindung die Verteilungsrechnung zulässig erscheint, die aber dann keine Andeutung von Adsorption ergibt.

Es soll nicht bestritten werden, daß, wie *Bechold* wiederholt betont^{2, 4, 6}, vieles für das Zustandekommen von Adsorptionsvorgängen zwischen Keimen und gelöstem Desinfiziens und auch für deren fallweise Bedeutsamkeit für den Absterbevorgang spricht, aber es war im vorstehenden zu zeigen, daß die bisher zum Nachweis solcher erwarteter Erscheinungen benutzten Methoden sich hierzu als untauglich erwiesen haben.

Mit Sicherheit wird die entscheidende Wirksamkeit von Oberflächenkräften für das Zustandekommen von Desinfektionswirkungen nur dort anzunehmen sein, wo die Desinfizienzen selbst mehrphasig sind, wie bei den Emulsionen von wasserunlöslichen oder durch Beimischung von Kohlenwasserstoffen teilweise unlöslich gemachten Phenolderivaten. *Chick* und *Martin*² konnten in einem solchen Falle durch mikroskopische Beobachtungen dartun, daß sich die in der

freien Flüssigkeit feststellbare Zahl der den Keimen gegenüber sehr kleinen emulgierten Tröpfchen nach Beimischen der Keimsuspension durch Anlegung jener an die Keimabflächen rasch vermindert und daß die quantitative Adsorptionswirkung getrockneter Staphylokokken der Tierkohle sehr nahekommmt.

Anhang.

Kurze Anleitung zur praktischen Prüfung flüssiger Desinfektionsmittel.

Für den häufigsten und wichtigsten Fall der praktischen Prüfung einer Desinfektionswirkung, nämlich für die Prüfung flüssiger Desinfektionsmittel, seien hier endlich diejenigen Methoden noch kurz zusammengefaßt, deren Anwendung den im Kapitel II, 2a bezüglich der bakteriologischen und im Kapitel III, 1a und c bezüglich der rechnerischen Methoden aufgestellten grundsätzlichen Forderungen entspricht und die somit als empfehlenswert gelten können.

Vorwegs sei bemerkt, daß es wegen der Verschiedenheit der zu prüfenden Wirkungen selbst und der in jedem Falle zu berücksichtigenden Umstände nicht angeht, für die Prüfung aller flüssigen Desinfektionsmittel ein normales Verfahren bis ins kleinste festzulegen. Es muß genügen, daß vermeidbare Fehler der Verfahrungsweise vermieden werden und daß diese selbst durch genaue Angaben für jeden Einzelfall eines Versuches beschrieben wird. Immerhin läßt sich der Rahmen zulässiger Methoden, wie im folgenden versucht sei, abstecken, doch kann eine „Normalisierung“ oder „Standardisierung“ niemals so weit gehen, daß die Ausführung der Prüfung jemand anderem als dem vollausgebildeten Fachbakteriologen zukommen könnte.

Prüfungsverfahren flüssiger Desinfektionsmittel.

Auf sorgfältig hergestellten, auf ihre Eignung geprüften Agarnährböden werden flächenhafte Kulturen der gewählten Testkeime, zumeist Milzbrandsporen, Staphylokokken, Typhus- oder Kolibakterien angelegt, die nach 1—2tägiger Bebrütung üppiges Wachstum mit Entwicklung aller charakteristischen Eigentümlichkeiten der Keimart zeigen müssen. Die durch Schütteln oder Verreiben mit wenig destilliertem Wasser gewonnene dichte Keimsuspension wird durch weitere Zufügung von Wasser auf ein Volum von 5—10 cm³ für je ein Kulturröhrchen gebracht und durch ein mittelfeines Papierfilter (Schleicher und Schüll 595) filtriert.

Sollen die Testkeime in getrocknetem Zustande verwendet werden, so wird die Suspension bei Zimmertemperatur im Vakuumexsiccator rasch an peinlich gereinigten Seidenfäden, Battist-, Leinenläppchen oder Tariergranaten angetrocknet und im CaCl₂-Exsiccator lichtgeschützt

und bei niedriger Temperatur bis zum Versuche verwahrt: für länger-dauernde Aufbewahrung sind sehr tiefe Temperaturen: — 80°, durch Äther und Kohlensäure schnell erreichbar, oder die Temperatur der flüssigen Luft, etwa — 180° erforderlich, für kürzere Aufbewahrungsdauer genügt gewöhnliche Kühltankschranktemperatur um 0°.

Die Exposition der Testkeime erfolgt niemals einem Mittel und einer Konzentration allein gegenüber, sondern immer in Gruppenversuchen mit abgestuften Konzentrationen und neben dem zu prüfenden Mittel immer auch mit einem anderen, dem gegenüber das Verhalten der Testkeime bereits festliegt. Am besten wird als solches Vergleichsmittel ein dem zu prüfenden in seiner Art nahestehendes gewählt, weil dann meist auch der weitere Gang der Versuche gleichgestaltet werden kann.

Das zunächst aufzustellende Versuchsprogramm hat in gleicher Weise auf Material und Zeit Rücksicht zu nehmen: Auf die verfügbaren Mengen gleichartigen Testmaterials und gleichartiger Nährböden für die Nachkultur, auf die verfügbare Zeit durch vorausgehende Festlegung aller Zeitpunkte für Überimpfungen oder Versuchsunterbrechungen. Die zu überprüfenden Konzentrationen des Mittels, allermindestens drei, sind in dem belangvollen Konzentrationsbereiche in geometrischer Reihenfolge zu wählen. Die Überimpfungs- oder Unterbrechungszeitpunkte sind um die als Abtötungszeiten erwarteten Werte in groben Vorversuchen in geometrischer, in genaueren Versuchen in arithmetischer Zeitfolge anzuordnen.

Bei der Suspensionsmethodik läßt man zu der mittels Pipette genau gemessenen Suspension das gleiche Volum, mindestens 1 cm^3 , des Desinfektionsmittels von doppelter Konzentration als die zu prüfende, rasch zufließen, wobei auf die gleiche und auch während der ganzen Versuchsdauer konstant festzuhaltende Temperatur aller Flüssigkeiten besonders zu achten ist. Nach genau gemessener Zeit ist die Einwirkung scharf zu unterbrechen, sei es durch Verdünnung bei Übertragung einer geachteten Öse (2 mg), sei es durch chemische Bindung des Desinfektionsmittels durch indifferente sterile Zusätze, deren Reaktionsprodukte mit dem Desinfektionsmittel und den Nährstoffen ebenfalls indifferent sein müssen, sei es endlich durch physikalische Trennung durch Zentrifugieren, nötigenfalls nach Fällung mittels gleicher Tropfenzahlen von 10%igen Na_2HPO_4 - und CaCl_2 -Lösungen, durch Filtrieren, Waschen, Herausschütteln der Keime mit Adsorbentien oder des Desinfektionsmittels mit Ölen u. a.

Bei den Trockenmethoden werden die keimtragenden Testobjekte in die Desinfektionslösung von der zu prüfenden Konzentration mittels Platingeräten sorgfältig, unter Vermeidung des Haftenbleibens von Luft eingetaucht. Die Temperaturkontrolle ist in gleicher Weise erforderlich. Die Unterbrechung der Einwirkung geschieht hier durch Wiederherausheben und steriles Spülen der Keimträger, nötigenfalls unter Verwendung geeigneter chemischer Bindungsmittel, bei Granaten als Keim-

trägern durch Abschütteln der angetrockneten Keime, indem sechs exponierte Granaten mit vier sterilen in 3 cm^3 Wasser durch 5 Minuten mit 700 Stößen in der Minute geschüttelt werden.

Welches von den angeführten Verfahren zur Vermeidung einer Entwicklungshemmung durch das mit den Keimen in die Nachkultur übertragene Desinfektionsmittel im Einzelfalle anzuwenden ist, und in welcher besonderen Form, muß auf Grund sorgfältiger Erwägungen der in der Literatur schon vorliegenden Angaben und nötigenfalls auf Grund neuer wissenschaftlicher Untersuchungen über die Hemmungswerte des Desinfektions- und des Bindungsmittels und ihrer in Betracht kommenden Reaktionsprodukte sowie über die Natur und den Ablauf der zustandekommenden chemischen Reaktionen und physikalischen Vorgänge entschieden werden.

Die Nachkultur der dem Desinfektionsmittel ausgesetzt gewesenen Keime hat unter den für das Wachstum günstigsten bekannten Bedingungen zu erfolgen. Bei den genannten häufigsten Testkeimen ist Bruttemperatur und Normalbouillon, bei Staphylokokken mit 2% Traubenzucker-, bei Milzbrandkeimen mit 30% Serumzusatz zu verwenden. Im letzteren Falle sind anscheinend steril gebliebene Röhrchen noch auf Agaroberfläche zu verimpfen. Staphylokokken können in manchen Fällen auch direkt auf die Oberfläche erstarrten Serums verimpft werden. Alle für eine Gruppe von Einzelversuchen einschließlich der erforderlichen Kontrollen und Vergleichsproben benötigten Nährböden müssen völlig identischer Herkunft, d. h. aus einer vorher gemischten Nährbodenpartie abgefüllt sein, weil nur in diesem Falle das Verhalten der Vergleichsversuche mit dem bekannten Desinfektionsmittel zugleich auch die Brauchbarkeit der Nährböden beweist. Die Beobachtung der Nachkultur ist durch 10 Tage fortzusetzen, weil geschädigte Keime oft später als andere anwachsen. In besonderen Fällen tritt an Stelle der Nachkultur der Tierversuch.

Das Ausbleiben des Wachstums in den optimalen flüssigen Medien bei optimaler Temperatur bildet die entscheidende Feststellung des normalen Desinfektionsversuches, der somit ein Endversuch ist. Durch zeitliche Staffelung sonst identischer Einzelversuche, die nebeneinander oder unmittelbar nacheinander ausgeführt werden, gelingt es, die kürzeste Zeit zu erheben, in der das Sterilbleiben der Nachkultur unter den gegebenen Bedingungen zuverlässig eintritt. Diese Grenze darf von der im Einzelversuch herangezogenen absoluten Keimzahl nicht abhängen: Kontrollversuche mit doppelter Keimzahl müssen gleiches Ergebnis haben; solange das nicht der Fall ist, muß die Keimzahl des Einzelversuches erhöht werden. Die verwendete Keimzahl ist in jedem Falle festzustellen.

Die unter Umständen erwünschte Zählung der in einem bestimmten Zeitpunkte noch überlebenden Keime ist nur mit tiefer Beschickung fester Nährböden bequem möglich, die jedoch im allgemeinen weniger

günstige Wachstumsbedingungen bieten als die flüssigen. Solche Zählversuche, bei denen ja auch auf die Erfassung der widerstandsfähigen Keime des exponierten Gemenges verzichtet wird, sind deshalb niemals allein, sondern nur neben den entscheidenden Endversuchen anzustellen.

Die Registrierung der Ergebnisse geschieht tabellarisch unter Eintragung des Ausfalles aller streng vergleichbar angestellten Einzelversuche oder Überimpfungen nach Zeitdauer und Konzentration geordnet. Die ganze Versuchsgruppe darf nur dann als gelungen gelten, wenn in der Kontrollreihe mit dem bekannten Desinfektionsmittel die zeitliche Abtötungsgrenze auch wirklich zu beobachten ist. Von den bei verschiedenen Konzentrationen des zu prüfenden Mittels angestellten Versuchsreihen sind auch nur jene voll gelungen, in denen die Abtötungsgrenze, also ein positiver und ein negativer Beobachtungswert vorliegt. Einzelne positive Werte zwischen zwei negativen können bei Endversuchen immer auftreten, weil ja das letzte Anwachsen nur auf vereinzelt Keimen beruhen kann. Hier gilt natürlich nur die höhere festgestellte Grenze zwischen negativer und positiver Abtötung. Häufige solche Unregelmäßigkeiten des Versuchsausfalles sind auf zu niedrige Keimzahlen, oder auch darauf zurückzuführen, daß die gewählten Zeitschritte zu klein waren.

Die festgestellten endgültigen Abtötungsgrenzen sind in ein Zeit-(T)-Konzentration (P)-Koordinatenfeld einzutragen, woraus sich durch graphischen Ausgleich der maximalen und minimalen Werte zu zusammenhängenden stetigen Linien der allgemeine Verlauf der Wirkungskurve ergibt. Die weitere Eintragung der log T- und log P-Werte in einem Koordinatenfelde läßt zumeist ohne Zwang eine gerade Linie durch den Schwarm der Punkte zeichnen, deren Neigung zur horizontalen P-Achse durch die Beziehung $\operatorname{tg} \alpha = n$ den konstanten Exponenten erkennen läßt, der in der Formel $T \cdot P^n = R$ den Verlauf der Wirkungskurve des geprüften Mittels beschreibt. R, die Resistenzkonstante der Testkeime gegen das Mittel ist aus jedem Punkte der ausgeglichenen Kurve berechenbar. Aus der Kenntnis der beiden Konstanten kann jede Zeitdauer der Wirkung eine bestimmte Konzentration und jede erforderliche Konzentration für eine bestimmte zeitliche Wirksamkeit innerhalb des Beobachtungsfeldes leicht berechnet werden.

Ergibt das beschriebene Verfahren keine gerade Linie, die die Punkte im log T- log P-Koordinatenfelde leidlich verbindet, so muß durch besondere langfristige Versuche mit niedrigen Konzentrationen jene Grenzkonzentration so genau als tunlich festgestellt werden, die überhaupt keine Abtötung der Testkeime bewirkt. Diese experimentell bestimmbare, in erster Annäherung auch in der Zeichnung im T-P-Koordinatenfelde als Abstand der der T-Achse parallelen Asymptote der Wirkungskurve von dieser Achse abschätzbare Wert p ist sodann von den P-Werten aller Beobachtungspunkte abzuziehen und es ist

sodann mit den Resten das obige Ermittlungsverfahren des n -Wertes zu wiederholen. Die Wirkungskurve lautet in solchen Fällen:

$$T \cdot (P-p)^n = R.$$

Den Abschluß jedes Desinfektionsversuches bildet der Vergleich der Wirkung des geprüften Mittels mit der des zugleich herausgezogenen bekannten Mittels. Dazu ist die Wirkungsgleichung des letzteren in genau derselben Weise, sowie für das neu zu prüfende Mittel festzulegen, wenn es nicht bereits aus früheren Versuchen ausreichend festliegt. Im letzteren Falle genügt eine Versuchsreihe mit bloß einer Konzentration des Vergleichsmittels, deren Ausfall die für die vorliegende Versuchsgruppe geltende Resistenzkonstante der Testkeime aus der bekannten Wirkungsgleichung berechnen läßt.

Die Kenntnis aller Konstanten der beiden Wirkungskurven gestattet nun für alle beliebigen T -Werte die zugehörigen P -Werte beider Mittel zu berechnen. Das reziproke Verhältnis des Konzentrationswertes des unbekannten zu dem des bekannten Mittels bildet den Wertindex des unbekannten Mittels für die angenommene Desinfektionsdauer, der somit umso größer ist, in je größerer Verdünnung das Mittel noch gleiche Wirkung wie das Vergleichsmaterial hervorbringt.

Literatur: *Amako*, Untersuchungen über das *Conradische* Ölbad und den Bakteriengehalt der Organe gesunder Tiere. *Zt. f. Hyg.* 1910, **LXVI**, S. 166. — *Anderson and Mac Clintic*, A method for the bacteriological standardisation of disinfectants. *J. of inf. dis.* 1911, **VIII**, S. 1. — *Arba*, Über einen Autoklavofen für bakteriologische Laboratorien. *Zbl. f. Bakt.* 1898, **XXIII**, S. 462. — *Arloing*: ¹ Influence de la lumière du soleil sur la végétation et les propriétés pathogènes du bacillus anthracis. *C. r. d. Ac. d. Sc.* 1885, **C**, S. 378; ² Influence du soleil sur la végétabilité des spores du bacillus anthracis. *C. r. d. Ac. d. Sc.* 1885, **CI**, S. 511; ³ Influence du soleil sur la végétation, la végétabilité et la virulence des cultures du bacillus anthracis. *C. r. d. Ac. d. Sc.* 1885, **CI**, S. 535; ⁴ Influence de la lumière blanche et de ses rayons constituantes sur le développement et les propriétés du bacillus anthracis. *A. d. physiol. norm. et path.* 1886, **VII**, S. 209; ⁵ Les spores du bacillus anthracis sont réellement tuées par la lumière solaire. *C. r. d. Ac. d. Sc.* 1887, **CIV**, S. 701; ⁶ Correspondence *Ann. Pasteur* 1887, **I**, S. 594. — *Arndt* s. *Reiter* u. *Arndt*. — *Arzt* u. *Kerl*, Zur Kenntnis der biologischen Wirkungen des Radiums. *Wr. kl. Woch.* 1913, S. 530. — *Aschkinas* u. *Caspari*: ¹ Über die Wirkung der Becquerelstrahlen auf Bakterien. *Ann. d. Phys.* 1901, **CCCXI**, S. 570; ² Über den Einfluß dissoziierender Strahlen auf organische Substanzen, insbesondere über die bakterienschädigende Wirkung der Becquerelstrahlen. *Pflügers A.* 1901, **LXXXVI**, S. 604. — *Aufrecht* s. *Roth*. — *Ballner*: ¹ Experimentelle Studien über die Desinfektionskraft gesättigter Wasserdämpfe bei verschiedenen Siedetemperaturen. *Jahr. d. Wr. Akad. d. Wiss. M.-n. Kl.* 1902, S. 111; **III**, S. 97; *Zbl. f. Bakt. Ref.* **XXXIII**, S. 365; ² Zur Methodik der Prüfung von Desinfektionsmitteln. *Hyg. Rundschau* 1903, **XIII**, S. 1065; ³ Desinfektion von Büchern. *Drucksachen* u. s. w. *Deuticke*, Wien 1907. — *Bartoschewitsch*, Die feuerfesten Wattepfropfen für die bakteriologischen Probierröhrchen. *Zbl. f. Bakt.* 1888, **IV**, S. 212. — *Bartsch*, Über Bücherdesinfektion mittels feuchter, heißer Luft und deren Einwirkung auf die Festigkeit von Papier. *Mitt. a. d. Kgl. Mat.-Prüf.-Amt zu Groß-Lichterfelde-West* 1909, **XXVII**, S. 138; *ref. Ges.-Ing.* 1909, S. 770. — *Baumann* s. *Dorn*, *Baumann* u. *Valentiner*. — *Baumgarten* u. *Luger*: ¹ Über die oligodynamische Wirkung von Metallen auf Fermente. *Wr. kl. Woch.* 1917, S. 1222; ² Über die Wirkung ver-

dünnter Metallsalzlösungen auf Diastase. Wr. kl. Woch. 1917, S. 1224; ³ Zur Theorie des sog. oligodynamischen Phänomens. Wr. kl. Woch. 1918, S. 188. — *Bechold* u. *Ehrlich*, Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Desinfektionswirkung. Zt. f. physiol. Ch. 1906, XLVII, S. 173. — *Bechold*: ¹ Desinfektionsmittel und ihre Prüfung. Zt. f. angew. Ch. 1909, S. 2033; ² Desinfektion und Kolloidchemie. Zt. f. Ch. u. Ind. d. K. 1909, DCXI, S. 5, Beiheft 1; ³ Halbspezifische Desinfektionsmittel. Zt. f. Hyg. 1909, LXIV, S. 113; ⁴ Die Kolloide in Biologie und Medizin. Steinkopf, Dresden; ⁵ Halbspezifische Desinfektionsmittel. II. Ein Beitrag zur Kenntnis von den biochemischen Eigenschaften der Halogen-naphthole. Zt. f. Hyg. 1918, LXXXIV, S. 1; ⁶ Adsorptionsdesinfektion durch Metallkombination und disperse galvanische Ketten. Zt. f. Elektrochemie 1918, XXIV, S. 147. — *Becker*, Vergleichende Untersuchungen über die Widerstandsfähigkeit von Anaerobiersporen gegen Siedehitze in Hirnbreiröhrchen. Zbl. f. Bakt. LXXXIV, S. 71. — *v. Behring*: ¹ Über HgCl₂ in eiweißhaltigen Flüssigkeiten. Zbl. f. Bakt. 1888, III, S. 27; ² Über Desinfektion, Desinfektionsmittel und Desinfektionsmethoden. Zt. f. Hyg. 1890, IX, S. 395; ³ Bekämpfung der Infektionskrankheiten. 1. Infektion und Desinfektion (mit *v. Lingelsheim*). Leipzig 1894. — *Bellei*, Verbesserte Methode zur Bestimmung des Wertes von chemischen Desinfektionsmitteln. M. med. Woch. 1904, S. 301. — *Benecke*, Giftwirkungen. Lafars Handb. d. techn. Mykol. Fischer, Jena 1904, I, S. 482. — *Berghaus*, Über die Wirkung der Kohlensäure, des Sauerstoffes und des Wasserstoffes auf Bakterien bei verschiedenen Druckhöhen. A. f. Hyg. 1903, XLV, S. 171. — *Betz* u. *Herzog* u. *Betz*. — *Beyer*, In welcher Konzentration tötet wässriger Alkohol allein oder in Verbindung mit anderen desinfizierenden Mitteln Entzündungs- und Eiterungserreger am schnellsten ab? Zt. f. Hyg. 1912, LXX, S. 225. — *Bial*, Zt. f. phys. Ch. 1902, XL, S. 513. — *Bie*: ¹ Methoden zur Messung der bactericiden Wirkung des Lichtes. Mitt. aus *Finsens* Med. Licht-Inst. 1905, XLVII; ² Über die bactericide Wirkung ultravioletter Strahlen. Mitt. aus *Finsens* Med. Licht-Inst. 1905, XLVII. — *Bierstein* s. *Paul*, *Bierstein* u. *Reuß*. — *Bitter*: ¹ Versuche über das Pasteurisieren der Milch. Zt. f. phys. Ch. 1902, XL, S. 513; ² Über das Absterben von Bakterien auf den wichtigsten Metallen und Baumaterialien. Zt. f. Hyg. 1911, LXIX, S. 483. — *Blumberg* s. *Kroenig* u. *Blumberg*. — *Blunt* s. *Downes* u. *Blunt*. — *Bocchia*, Über die desinfizierende Kraft des absoluten Amylalkohols in kochendem und im Dampfzustand. Zbl. f. Bakt. 1909, L, S. 469. — *Boerner*, Maßstab zur Prüfung der Leistungsfähigkeit von Desinfektionsapparaten. Zbl. f. Bakt. 1910, LIII, S. 413. — *Bojakovsky*, Untersuchungen über das quantitative Verhalten des Phenols bei der Einwirkung auf Bakterien. Inaug.-Diss. Freiburg 1912. — *Bojakovsky* s. auch *Küster* u. *Bojakovsky*. — *Bokorny*, Notiz über die Giftigkeit einiger Anilinfarben und anderer Stoffe. Ch. Zt. 1906, S. 217. — *O. Bondy*, Versuche über die bactericide Wirkung des Mesothoriums. Zbl. f. Geb. u. Gyn. 1913, S. 1142. — *Bordas*, C. r. de l'Ac. d. Sc. 1904, CXXXVIII, S. 1287. — *Bordier* u. *Horand*, C. r. d. Ac. d. Sc. 1910, CL. — *Breslauer*, Über die antibakterielle Wirkung der Salben mit besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Konstituentien auf den Desinfektionswert. Zt. f. Hyg. 1895, XX, S. 161. — *Brooks*, Temperature and toxic action. Bot. Gazette, Nov. 1906. — *v. Brunn*, Alkoholdämpfe als Desinfektionsmittel. Zbl. f. Bakt. 1900, XXVIII, S. 309. — *Buchner*: ¹ Über den Einfluß des Lichtes auf Bakterien. Zbl. f. Bakt. 1892, XI, S. 781; XII, S. 217; ² Über den Einfluß des Lichtes auf Bakterien und über die Selbstreinigung der Flüsse. A. f. Hyg. 1893, XVII, S. 179. — *Budde*, Versuche über die Bedeutung der Spannung und Strömungsgeschwindigkeit des Dampfes bei Desinfektion in Dampfapparaten. Ugeskrift for Laeger 1891, XXV, Nr. 28—30. — *Bujwid*, Über die Wirkung des Lichtes auf Bakterien unter besonderer Berücksichtigung der ultravioletten Strahlen. Ost. Viert. f. Ges. 1911, II, S. 55. — *Bullok*, The value of the autoclave in the Sterilisation of anhydrous oily substances. J. of stat. Med. 1913, XXI, S. 696. — *Bürgers*, *Schermann* u. *Schreiber*, Über die Auflösungs-

erscheinungen an Bakterien. *Zt. f. Hyg.* 1912, **LXX**, S. 119. — *Bürgi*, Chemische Desinfektionslehre. *Kolle-Wassermanns Handb. der pathog. Mikroorganismen*. 2. Aufl. S. Fischer, Jena 1913, **III**, S. 543. — *Burri*, Das Sterilisieren. *Lafars Handb. d. techn. Mykologie*. Fischer, Jena 1906, **I**, S. 514. — *Buttersack*, Beiträge zur Desinfektionslehre und zur Kenntnis der Kresole. *Arb. a. d. Kais. Ges.* 1893, **VIII**, S. 357. — *Caspari* s. *Aschkinas* u. *Caspari*. — *Ceppi*, Quelques expériences relatives à l'action de certaines substances antiseptiques sur un microbe de la suppuration. *Korr.-Bl. f. Schw. Ä.* 1893, S. 788; *Ref. Baumgartens Jahrb.* 1893, S. 557. — *Harriette Chick*: ¹ An investigation of the laws of disinfection. *J. of Hyg.* 1908, **VIII**, S. 92; ² The process of disinfection by chemical agencies and hot water. *J. of Hyg.* 1910, **X**, S. 237. — *H. Chick* u. *Martin*: ¹ The principles involved in the standardisation of disinfectants and the influence of organic matter upon germicidal value. *J. of Hyg.* 1908, **VIII**, S. 654; ² A comparison of the power of a germicide emulsified or dissolved, with an interpretation of the superiority of the emulsified form. *J. of Hyg.* 1908, **VIII**, S. 698. — *Chlopin* u. *Tamann*, Über die Desinfektion mit Chlor und Brom. *Mitt. a. d. Kais. Ges.* 1884, **II**, S. 228. — *Christen*, Untersuchungen über die Dauer des Sterilisationsprozesses im gespannten Dampfe bei gegebener fixer Temperatur. *Inaug.-Diss.* Bern 1895. — *Christian*, Die biologische Wirkung der Desinfektion durch vereinigte Wirkung gesättigter Wasserdämpfe und flüchtiger Desinfektionsmittel bei künstlich erniedrigtem Luftdruck. *Hyg. R.* 1907, S. 841. — *Clark*, *Bot. Gaz.* 1899, **XXVIII**, S. 289. — *Conradi*: ¹ Über den Keimgehalt normaler Organe. *M. med. Woch.* 1909, S. 1318; ² Ein neues Sterilisierungsverfahren. *D. med. Woch.* 1909, S. 1015. — *Croner*: ¹ Beitrag zur Theorie der Desinfektion. *Zbl. f. Bakt.* 1912, **LXI**, S. 175; ² Lehrbuch der Desinfektion. *Klinkart*, Leipzig 1913. — *Croner* u. *Naumann*, Vergleichende Untersuchungen über die Desinfektionswirkung von Sublimat und Sublamin. *D. med. Woch.* 1911, S. 1784. — *Czaplewski*: ¹ Kontrolle der Desinfektion. *Ber. d. VII. int. Kongr. f. Hyg. u. D.* in Berlin 1907. 1908, **II**, S. 983; ² Beiträge zur bakteriologischen Prüfung von Desinfektionsmitteln. Eine einfache Methode zur Prüfung von Desinfektionsmitteln. *Desinfektion* 1911, **IV**, S. 417. — *Dannappel*, Inwieweit ist die höhere Widerstandsfähigkeit der Bakteriensporen ein allgemeines Charakteristicum derselben gegenüber den vegetativen Pilzformen. *Preisschrift der Universität Königsberg* 1899. — *Danysz*, De l'action pathogène des rayons et des émanations émises par le Radium sur différents tissus et différents organismes. *Sci. med.* 1903, S. 64. — *Delépine*, The Standardizing of Disinfectants. *J. of the R. Inst. of Publ. H.* 1908, **XVI**, S. 577. — *Dengler* s. *Süpfle* u. *Dengler*. — *Dernoschek* (s. auch *Wo. Ostwald* u. *Dernoschek*), Studien über die Giftigkeit von Seewasser für Süßwassertiere u. a. *Pflügers A.* 1911, **CXLIII**, S. 303. — *Dienes*, Über Tiefenwirkung des Formaldehyds. *Zt. f. Hyg.* 1913, **LXXIII**, S. 43. — *Dieudonné*: ¹ Beitrag zur Beurteilung der Einwirkung des Lichtes auf Bakterien. *Arb. a. d. Kais. Ges.* 1894, **IX**, S. 405; ² Über die Bedeutung des Wasserstoffsuperoxyds für die bakterientötende Kraft des Lichts. *Arb. a. d. Kais. Ges.* 1894, **IX**, S. 537. — *Döderlein*, Die Bakterien aseptischer Operationen. *M. med. Woch.* 1899, S. 853. — *Doerr*, Zur Oligodynamie des Silbers. *B. Z.* 1920, **CVI**, S. 110; *B. Z.* 1920, **CVII**, S. 207. — *Döll* s. *Steiger* u. *Döll*. — *Dold*, Über Bakterientransport durch den Dampf bakterienhaltiger Flüssigkeiten. *Zbl. f. Bakt.* 1920, **LXXXIV**, S. 558. — *Dorn*, *Baumann* u. *Valentiner*, Über die Einwirkung der Radiumemanation auf pathogene Bakterien. *Zt. f. Hyg.* 1905, **LI**, S. 328. — *Downes* u. *Blunt*, *Roy. soc. Proc.* 1877, **XXVI**, S. 488; **XXVIII**, S. 199; 1878, **XL**, S. 14. — *Dreser*, Zur Pharmakologie des Quecksilbers. *A. f. exp. Path. u. Pharm.* 1893, **XXXII**, S. 456. — *Duclaur*: ¹ Influence de la lumière du soleil sur la vitalité des microbes. *C. r. de l'Ac. d. Sc.* 1885, **CI**; ² Influence de la lumière du soleil sur la vitalité des germes des microbes. *C. r. de l'Ac. d. Sc.* 1885, **X**, S. 57. — *Edwards* s. *Kendall* u. *Edwards*. — *Ehrlich* s. *Beckhold* u. *Ehrlich*. — *Eichholz*, Wirkung des H₂O₂ auf Metalle und seine Verwendbarkeit zur Desinfektion von Instrumenten.

Med. Kl. 1913, H. 51. — *Eijkmann*: ¹ Ein Vorlesungsversuch auf dem Gebiete der Dampfdesinfektion. Zbl. f. Bakt. 1903, XXXIII, S. 567; ² Die Überlebenskurve bei Abtötung der Bakterien durch Hitze. Bioch. Zt. 1908, IX, S. 12. — *Eisenberg*: ¹ Zbl. f. Bakt. 1909, XLVIII, S. 197; ² Halbspezifische Desinfektionsvorgänge. Zbl. f. Bakt. 1915, LXXI, S. 420; ³ Über spezifische Desinfektionsmittel. Der Militärarzt 1916, S. 577. — *Eisenberg* u. *Okolska*, Untersuchungen zur Theorie der Desinfektion. Zbl. f. Bakt. 1913, LXIX, S. 302. — *Engels*, Untersuchungen über die bactericide Wirkung in Alkohol gelöster Desinfizienzien auf Bakterienarten. Zbl. f. Bakt. 1903, XXXIII, S. 786. — *v. Esmarch*: ¹ Die desinfizierende Wirkung des strömenden überhitzten Dampfes. Zt. f. Hyg. 1886, IV, S. 198; ² Das Kreolin. Zbl. f. Bakt. 1887, II, S. 295; ³ Die Milzbrandsporen als Testobjekt bei der Prüfung von Desinfizienzien. Zt. f. Hyg. 1889, V, S. 67; ⁴ Die Wirkung von Formaldehyd-wasserdämpfen im Desinfektionsapparat. Hyg. R. 1902, S. 961. — *Esslinger*, Über die Wirkung photodynamischer (fluoreszierender) Stoffe auf Fadenpilze. Inaug.-Diss. München 1905. — *Eugling*, Über die Desinfektionswirkung des Jodoforms und des Novojodins. Zbl. f. Bakt. 1911, LX, S. 397. — *Faustus* u. *Florence Rumry*, An inquiry into the causes for variation in determination of disinfection value. J. of inf. dis. 1920, XXVI, S. 351. — *Ficker*: ¹ Über Lebensdauer und Absterben von pathogenen Keimen. Zt. f. Hyg. 1898, S. 291; ² Über die Resistenz von Bakterien gegenüber dem Trocknen. Zt. f. Hyg. 1907, LIX, S. 367. — *Findel*, Desinfektion von Büchern, militärischen Ausrüstungsgegenständen, Pelzen u. s. w. mit heißer Luft. Zt. f. Hyg. 1907, LVII, S. 83. — *Firth* u. *Macfadyen*, Rep. of the Desinfectant Standardisation Committee. J. of Roy. San. Inst. 1906, XXVII, S. 17. — *Fischer* u. *Proskauer*, Über die Desinfektion mit Chlor und Brom. Mitt. a. d. Ges.-Amt. 1884, II, S. 228. — *Flügge*, Die Wohnungsdesinfektion mit Formaldehyd. Zt. f. Hyg. 1898, XXIX, S. 276. — *Foa*, L'azione dei gas compressi nella vita dei microorganismi e fermenti. Atti della R. Accad. d. Lincei 1906, XV, S. 1. — *Forster*: ¹ Über die Einwirkung von hohen Temperaturen auf Tuberkelbacillen. Hyg. R. 1892, S. 868; ² Über die Einwirkung von hohen Temperaturen auf Tuberkelbacillen. Hyg. R. 1893, S. 668. — *Foulerton* s. *Ransome* u. *Foulerton*. — *C. Fraenkel*, Die desinfizierenden Eigenschaften der Kresole, ein Beitrag zur Desinfektionsfrage. Zt. f. Hyg. 1889, VI, S. 521. — *G. Frank*: ¹ Über Desinfektion durch Dämpfe. Zt. f. öff. Chem. 1899; ² Über Desinfektionswirkung des Alkohols, insbesondere der Alkoholdämpfe. M. med. Woch. 1901, S. 134. — *Franz*, Licht als Desinfizienz. Zbl. f. Hyg. 1909. — *Frei*, Versuche über Kombination von Desinfektionsmitteln. Zt. f. Hyg. 1914, LXXV, S. 433. — *Friedberger* (s. *Pfeiffer* u. *Friedberger*), Weitere Versuche über ultraviolettes Licht. 3. Mitt. Berl. klin. Woch. 1914, S. 1402. — *Friedberger* u. *Jamamoto*, Über den Einfluß von Desinfektionsmitteln auf invisible Virusarten. Zt. f. Hyg. 1914, LXXVI, S. 97. — *Friedberger* u. *Joachimoglu*, Über die Abhängigkeit der keimtötenden und entwicklungshemmenden Wirkung von der Valenz. Biochem. Zt. 1917, LXXIX, S. 315. — *Friedberger* u. *Mironescu*, Eine neue Methode, Vaccine ohne Zusatz von Desinfizienzien unter Erhaltung der Virulenz keimfrei zu machen. II. Mitt. über die Wirkung ultravioletter Strahlen. D. med. Woch. 1914, S. 1203. — *Friedental*, Absolute und relative Desinfektionskraft von Elementen und chemischen Verbindungen. Biochem. Zt. 1919, XCIV, S. 47. — *Frosch* u. *Clarenbach*, Über das Verhalten des Wasserdampfes im Desinfektionsapparat. Zt. f. Hyg. 1890, IX, S. 183. — *Gaffky* s. *Koch*, *Gaffky* u. *Löffler*. — *Gaillard*, De l'influence de la lumière sur le micro-organismes. Lyon 1888. — *Gegenbauer* u. *Reichel*, Die Desinfektion milzbrandiger Häute und Felle in HCl-NaCl-Gemischen. A. f. Hyg. 1912, LXXVIII, S. 1. — *Gegenbauer* s. *Reichel* u. *Gegenbauer*. — *Gegenbauer*: ¹ Über das Seymour-Jones'sche HgCl₂-HCOOH-Verfahren zur Desinfektion milzbrandiger Häute und Felle. A. f. Hyg. 1918, LXXXVII, S. 289; ² Studien über die Desinfektionswirkung des HgCl₂. A. f. Hyg. 1921, XC, S. 23. — *Geisler*, Zur Frage über die Wirkung des Lichtes auf Bakterien. Zbl. f. Bakt. 1892, XI, S. 161. — *Geppert*: ¹ Zur Lehre von

den Antiseptics. Berl. kl. Woch. 1889, S. 789; ² Über desinfizierende Mittel und Methoden. Berl. kl. Woch. 1890, S. 246; ³ Die Desinfektionsfrage. D. med. Woch. 1891, S. 797. — *van Geuns*, Über die Einwirkung des sog. „Pasteurisierens“ auf die Milch. A. f. Hyg. 1885, III, S. 465. — *Glaser*, Beiträge zur Kenntniss der Sterilisation mit ultravioletttem Licht. Wr. kl. Woch. 1911, S. 1157. — *Globig*, Über einen Kartoffelbacillus mit ungewöhnlich widerstandsfähigen Sporen. Zt. f. Hyg. 1888, III, S. 332. — *Golowkoff*, Der Einfluß der Neutralisation der Phenole bei Desinfektion der Milzbrandsporen. Milzbrandsporen von außerordentlicher Widerstandsfähigkeit. Mil.-med. J. (russ.) 1898, S. 838; ref. Zbl. f. Bakt. 1899, XXV, S. 889. — *Gottschlich*, Desinfektionslehre. Kolle-Wassermanns Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., Fischer, Jena 1913, III, S. 443. — *Gottstein*, Sublimat-Lanolin als Antisepticum. Th. Mon. 1889, S. 3. — *Gottstein* s. *Spilker* u. *Gottstein*. — *Graßberger*: ¹ Die Desinfektion in Theorie und Praxis. Rubner, v. Gruber u. Fickersches Handbuch der Hygiene. Hirtzel, Leipzig 1913, S. 4; ² Desinfektionstechnik und Beurteilung der Desinfektion auf Grund der neueren Erfahrungen. Zt. f. öff. Ges. 1916, IV, S. 81. — *Gregersen*, Untersuchungen über die desinfizierende Kraft der desinfizierenden Stoffe im Verhältnis zu ihrer Konzentration. Zbl. f. Bakt. 1916, LXXVII, S. 168. — *Grimm*, Versuche über das Absterben von Bakterien in physiologischer Kochsalzlösung und in Milch bei Kochen unter erniedrigtem Druck. Inaug.-Diss., Berlin 1906; ref. Zbl. f. Bakt. 1906, XL, S. 97. — *Grober* u. *W. L. Pauli*, Untersuchungen über die biologische Wirkung der Kathodenstrahlen. D. med. Woch. 1919, S. 841. — *Osk. Gros*: ¹ Über die Hämolyse von NH₃, NaOH und NaCO₃. Biochem. Zt. 1910, XXIX, S. 350; ² Über den Vorgang der bactericiden Wirkung der Ag-Präparate in NaCl-haltigen Medien. M. med. Woch. 1911, S. 2695. — *Gruber*: ¹ Über die Thurstfieldschen Desinfektoren. Zur Erklärung der Desinfektionskraft des Wasserdampfes. Ges.-Ing. 1888, S. 281, 394, 602; ² Erklärung der Desinfektionskraft des Wasserdampfes. Zbl. f. Bakt. 1888, III, S. 634; ³ Über Methoden der Prüfung von Desinfektionsmitteln. Referat am 7. intern. Kongr. f. Hyg. u. D. zu London 1891; ref. Zbl. f. Bakt. 1892, XI, S. 115. — *Haas*, Prag. med. Woch. 1876, Nr. 34—36. — *Hagemann*, Beitrag zur Methodik der Prüfung von Desinfektionsmitteln. Zt. f. Med.-Beamte 1904, S. 471. — *Hailer*: ¹ Die Abtötung von Milzbrandsporen an Häuten und Fellen durch HCl-NaCl-Lösung. Arb. d. Kais. Ges. 1914, XLVII, S. 69; ² Vergleichende Versuche über die Einwirkung chemischer Mittel auf Kleiderläuse. Arb. a. d. Kais. Ges. 1920, LV, S. 278; ³ Über Kresole und Ersatzmittel für Kresolseife. IV. Zur Methode der Desinfektionsprüfung bei Kresolen A. G. A. 1920, LII, S. 696. — *Halberstätter*, Experimentelle Untersuchungen an Trypanosomen über die Strahlenwirkung. Berl. kl. Woch. 1914, S. 252. — *B. Hammer*, A note on the vacuum desiccation of bacteria. J. of med. res. 1911, XXIV, S. 527. — *H. Hammer*, Über die desinfizierende Wirkung der Kresole und die Herstellung neutraler, wässriger Kresollösungen. A. f. Hyg. 1892, XIV, S. 116. — *Hartmann*, Über den Einfluß von Temperatur und Konzentration auf die Giftigkeit von Lösungen, besonders Elektrolyten. Pflügers A. 1918, CLXX, S. 585. — *Heider*: ¹ Die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln bei höherer Temperatur. Zbl. f. Bakt. 1891, IX, S. 221; ² Über die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel bei erhöhter Temperatur. A. f. Hyg. 1892, XV, S. 341. — *Heim*, Lehrbuch der Bakteriologie. 5. Aufl. Enke, Stuttgart 1918. — *Henke*, Arb. a. d. path.-anat. Inst. Tübingen 1894, S. 2. — *Henle*, Über Kreolin und seine wirksamen Bestandteile. A. f. Hyg. 1892, S. 9. — *Mme. Henry-Cernovodeanu* et *Henry*, Action des rayons ultraviolets sur les microorganismes. J. de physiol. et de path. gen. 1912, XIII, S. 865. — *Henry*, Technique de l'infection artificielle de l'eau pour l'étude de l'action sterilisante des rayons ultravioletes. C. r. de la Soc. de biol. 1911, S. 7. — *Heraeus*, Sublimatdämpfe als Desinfektionsmittel. Zt. f. Hyg. 1886, I, S. 142. — *M. Herzog*, Experimentelle Beiträge zur Formaldehyd-Wasserdampfdesinfektion. Zbl. f. Bakt. 1903, XXXIV, S. 170. — *Herzog* u. *Betz*: ¹ Zur Theorie der Desinfektion. Zt. f. physiol. Ch.

1910, LXVII, S. 369; ² Zur Theorie der Desinfektion. Zt. f. physiol. Ch. 1911, LXXIV, S. 221. — *Hewlett*, Desinfection and disinfectants. Lanc. März 1909. — *Hewlett* u. *Normann*, The influence of the cultur medium on the germination of anthrax spores with special reference to disinfection experiments. J. of hyg. 1912, XI, S. 473. — *Hill*, A method of preparing test objects for disinfection experiments. Rep. a. Pap. of the Am. Publ. Health Ass. 1898, XXIV, S. 246. — *Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe. 1. Aufl., Leipzig 1902; 4. Aufl., 1914. — *Hoffmann*: ¹ Über die Wirkung der Radiumstrahlen auf Bakterien. Hyg. R. 1903, S. 913; ² Über den Einfluß hohen Kohlensäuredrucks auf Bakterien mit Wasser und in der Milch. A. f. Hyg. 1907, LVII, S. 379; ³ D. mil.-ärztl. Zt. 1907, S. 691. — *Holzinger*, Zbl. f. Bakt. 1908, II, S. 21. — *Horand* s. *Bordier* u. *Horand*. — *Huber*, Prüfung der Wirkung des Tageslichtes auf Lebensfähigkeit und Virulenz der Bakterien etc. A. f. Hyg. 1905, LIV, S. 53. — *Hueppe*: ¹ Untersuchungen über die Zersetzungen der Milch durch Mikroorganismen. Mitt. a. d. Kais. Ges. 1884, II, S. 309; ² Über die desinfizierenden Eigenschaften des Aseptol. Berl. kl. Woch. 1886, XIII, S. 609; ³ Die Methoden der Bakterienforschung. 1. Aufl., Kreidel, Wiesbaden 1885; 5. Aufl., 1891. — *Hüne*: ¹ Prüfung von Desinfektionsapparaten mittels Testobjekte. D. mil.-ärztl. Zt. 1908, S. 211; ² Beitrag zur Hygiene der Wandanstriche. Zt. f. Hyg. 1911, LXIX, S. 243. — *Ikeda* s. *Koenig* u. *Paul*. — *Iwanoff*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1904, XIII, S. 139. — *Jacobitz*, Über desinfizierende Wandanstriche. Zt. f. Hyg. 1901, XXXVII, S. 90. — *Jamamoto* s. *Friedberger* u. *Jamamoto*. — *Janowski*, Zur Frage über die Wirkung des Lichtes auf Bakterien. Zbl. f. Bakt. 1890, VIII, S. 167. — *Jansen*, Untersuchungen über die bactericide Wirkung der Radiumemanation. Zt. f. Hyg. 1910, LXVII, S. 135. — *Jansen* u. *Strandberg*, Untersuchungen darüber, ob die Bactericidität der Radiumemanation auf Ozonentwicklung zurückzuführen ist. Zt. f. Hyg. 1912, LXXI, S. 223. — *Jastram*, Über die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf das Wachstum von Bakterien. Inaug.-Diss. Breslau 1905. — *Joachimglu* s. *Friedberger* u. *Joachimglu*. — *Jodlbauer* u. *Tappeiner*, Wirkung der fluorescierenden Stoffe auf Spalt- und Fadenpilze. D. A. f. kl. Med. 1906, LIV, H. 5 u. 6. — *Johnston*, Methode of testing disinfection. Rep. a. Papers of the Am. Publ. Health Ass. XXIV, S. 250; ref. Baumgartens Jahresh. 1898, XIV, S. 938. — *Kausch*, Neuerungen auf dem Gebiete der Desinfektion und Sterilisation. Zbl. f. Bakt. Ref. 1902, XXXI, S. 265, 668; 1903, XXXII, S. 545, 737; 1904, XXXIV, S. 82, 545; XXXV, S. 65, 689; 1905, XXXVI, S. 97; 1906, XXXVII, S. 190, 567; XXXVIII, S. 102; 1908, XL, S. 5. — *Kendall* u. *Edwards*, A method for determining the germicidal value and penetrating power of liquid disinfectants. J. of inf. dis. 1911, VIII, S. 250. — *Kleemann* s. *Stadler* u. *Kleemann*. — *Kneubühler*, Über verschiedene Einflüsse auf die Sporenresistenz mit besonderer Berücksichtigung der Nährböden. Schweiz. Woch. f. Chem. u. Pharm. 1907, S. 602. — *v. Knorre* s. *Wolffhügel* u. *Knorre*. — *Koch*: ¹ Über Desinfektion. Mitt. a. d. Kais. Ges. 1881, I, S. 234; ² Berl. kl. Woch. 1882. — *Koch* u. *Wolffhügel*, Untersuchungen über die Desinfektion mit heißer Luft. Mitt. a. d. Kais. Ges. 1881, I, S. 301. — *Koch*, *Gaffky* u. *Löffler*, Versuche über die Verwertbarkeit heißer Wasserdämpfe zu Desinfektionszwecken. Mitt. a. d. Kais. Ges. 1881, I, S. 322. — *Kokubo*: ¹ Die kombinierte Wirkung chemischer Desinfektionsmittel. Zbl. f. Bakt. 1902, XXXII, S. 234; ² Über die Anfertigung und Aufbewahrung von Sporenscheiden für Desinfektionszwecke. Zbl. f. Bakt. 1903, XXXIV, S. 725. — *Kosiakoff*, De la propriété que possèdent les microbes de s'accommoder aux milieux antiseptique. Ann. Pasteur 1887, S. 465. — *Krause*, Über durch Pressung gewonnenen Zellsaft des *Bacillus pyocyaneus* nebst einer kurzen Mitteilung über die Einwirkung des Druckes auf Bakterien. Zbl. f. Bakt. 1902, XXXI, S. 673. — *Krenker* s. *Levy* u. *Krenker*. — *Kříženecký*, Beitrag zum Studium der Bedeutung osmotischer Verhältnisse des Mediums für Organismen. Pflügers A. 1916, S. 163, 325. — *Kroenig* u. *Blumberg*, Vergleichende Untersuchungen über den Wert der mechanischen und der Alkoholdesinfektion der

Hände gegenüber der Desinfektion mit Quecksilbersalzen, speziell dem Quecksilberäthylendiamin. M. med. Woch. 1900, S. 1004. — *Kroenig u. Paul*: ¹ Zt. f. physik. Ch. 1896, **XXI**, S. 414; ² Die chemischen Grundlagen der Lehre von der Giftwirkung und Desinfektion. Zt. f. Hyg. 1897, **XXV**, S. 1; ³ Ein Apparat zur Sterilisierung von Laboratoriumgeräten bei Versuchen mit pathogenen Mikroorganismen. M. med. Woch. 1899, S. 1533. — *Krombholz*: ¹ Untersuchungen über Desinfektionswirkung des Antans. Wr. klin. Woch. 1908, S. 389; ² Über Keimzählung mittels flüssiger Nährböden mit besonderer Berücksichtigung der Colitstreueverfahren. A. f. Hyg. 1915, **LXXXIV**, S. 151; 1916, **LXXXV**, S. 117 u. **LXXXVIII**, S. 241. — *Krüger*, Über den Einfluß konstanter elektrischer Ströme auf Wachstum und Virulenz der Bakterien. Zt. f. klin. Med. 1893, **XXII**, S. 191. — *Kruse*, Über die hygienische Bedeutung des Lichtes. Zt. f. Hyg. 1895, **XIX**, S. 313. — *Küster*, Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung neuerer Händedesinfektionsmethoden. Arb. a. d. Kais. Ges. 1914, **XLVIII**, S. 412. — *Küster u. Bojakowsky*, Untersuchungen über das quantitative Verhalten des Phenols bei der Einwirkung auf Bakterien. Desinfektion 1912, **V**, S. 193. — *Küster u. Bojakowsky*, Untersuchungen über das quantitative Verhalten des Phenols auf Bakterien. Zt. f. Hyg. 1913, **LXXIII**, S. 205. — *Kuznitsky*, Über biologische Strahlenwirkung, besonders der α -Strahlen. Der bactericide Einfluß von Thorium-X allein und im Zusammenwirken mit verschiedenen chemischen Desinfizienzien. Zt. f. Hyg. 1920, **LXXXVIII**, S. 261. — *Laplace*, M. med. Woch. 1887, S. 866. — *Latraye s. Miquell u. Latraye*. — *Laubenheimer*: ¹ Phenol und seine Derivate als Desinfektionsmittel. Urban & Schwarzenberg, Berlin 1909; ² Allgemeine Bakteriologie und Desinfektionslehre. G. Fischer, Jena 1915. — *Lehmann*, Experimentelle Studien über den Einfluß technisch und hygienisch wichtiger Gase und Dämpfe auf den Organismus **XVI—XXIII**. A. f. Hyg. 1911, **LXXV**, S. 1. — *Lehmann u. Zierler*, Untersuchungen über die Abtötung von Bakterien durch schwache, therapeutisch verwertbare Ströme. A. f. Hyg. 1903, **XLVI**, S. 221. — *Lenti*, Ann. inst. d'igiene. Roma, **III**, S. 518. — *Leube*, Virchows A. 1885. — *Levy u. Krenker*, Über die bactericide Wirkung des Glycerins. Hyg. R. 1908, S. 323. — *Lewith*, A. f. C. Path. u. Pharm. 1890, **XXVI**, S. 641. — *Liborius*, Einige Untersuchungen über die desinfizierende Wirkung des Kalkes. Zt. f. Hyg. 1887, **II**, S. 15. — *Liebreich*, Th. Mon. 1887, **H. 1**. — *v. Lingelsheim s. v. Behring*³. — *Lode*, Studien über die Absterbebedingungen der Sporen einiger Aspergillusarten. A. f. Hyg. 1902, **XLII**, S. 107. — *J. Loeb*, On the relative toxicity of distilled water, sugar solutions and solutions of the various constituents of the sea-water for marine animals. Univ. of Cal. Publ. 1903, **I**, S. 58. — *Löffler* (s. auch *Koch, Gaffky u. Löffler*). Zur Therapie der Diphtherie. D. med. Woch. 1891, **H. 1**. — *Loewe*, Ein natürliches System der Giftwirkungen. München 1893. — *Loy-Paluffe*, Azione battericida della luce solare diretta in rapporto alla qualità degli oggetti su cui germi sono depositi. Rif. med. Napoli 1903, **Nr. 2**. — *Lubenau*, Zur Prüfung von Desinfektionsmitteln. Hyg. R. 1907, S. 266. — *Luger s. Baumgarten u. Luger*. — *Mac Clintic s. Anderson u. Mac Clintic*. — *Macfadyen s. Firth u. Macfadyen*. — *Madsen u. Nyman*, Zur Theorie der Desinfektion. Zt. f. Hyg. 1907, **LVII**, S. 389. — *Maillard*, C. r. Soc. de Biol. 1899. — *de Man*, Über die Einwirkung von hohen Temperaturen auf Tuberkelbacillen. A. f. Hyg. 1893, **XVIII**, S. 133. — *Mann*, Action de certaines substances antiseptiques sur la levure. Ann. Pasteur 1894, **VIII**, S. 785. — *Martin s. Chick u. Martin*. — *Marr*, Zur Theorie der Desinfektion. Zbl. f. Bakt. 1900, **XXVIII**, S. 691. — *Maschek*, Beiträge zur Theorie der Desinfektion. Selbstverlag des Verfassers. Leitmeritz 1890. Ref. Zbl. f. Bakt. 1892, **XI**, S. 808. — *May*, Über die Infektiosität der Milch perlsüchtiger Kühe. A. f. Hyg. 1883, **I**, S. 121. — *Ernst Mayer*, Versuche zur quantitativen Auswertung der keimtötenden Kraft von Phenol mit Hilfe abgemessener Bakterienaufschwemmungen. Inaug.-Diss. Freiburg i. B. 1911. — *Eug. Mayer*, Über die Desinfektionswirkung durch Gemische von Wasserdampf mit Formaldehyd und Carbonsäure

bei niedrigem Dampfdruck. Hyg. R. 1903, S. 281. — *H. H. Mayer*, A. f. exp. Path. u. Pharm. 1899, **XLII**, S. 109. — *Mayer* u. *Wolpert*: ¹ Über die Verstärkung der Desinfektionswirkung des Formaldehyds durch allseitigen Innenwind. A. f. Hyg. 1902, **XLIII**, S. 171; ² Über den Einfluß der Lufttemperatur auf die Desinfektionswirkung des Formaldehyds. A. f. Hyg. 1902, **XLIII**, S. 221. — *Merke*, Ein billiger und einfacher Dampfsterilisator. Berl. kl. Woch. 1892, S. 931. — *Mettler*, Experimentelles über die bactericide Wirkung des Lichtes auf mit Eosin, Erythrosin und Fluorescein gefärbte Nährböden. A. f. Hyg. 1905, **LIII**, S. 80. — *Minorescu* s. *Friedberger* u. *Minorescu*. — *Miquel*, Les organismes vivants et l'atmosphère. Paris 1883. — *Miquel* u. *Lattraye*, A. de microgr. 1895, **VII**, S. 110. — *Miramond de Laroquette*, Experiences sur l'action bactericide de la lumière solaire. Ann. Pasteur 1918, **XXXII**, S. 170. — *Morawitz* u. *Freundlich*, Kolloidchem. Beih. 1910, **I**, S. 301. — *Morgenroth*, Zur Kenntnis der Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und chemotherapeutischer Wirkung. Berl. med. klin. Woch. 1917, S. 155. — *Much* u. *Römer*, Ein Verfahren zur Gewinnung einer von lebensfähigen Keimen freien, in ihren gemeinen Eigenschaften im wesentlichen unveränderte Kuhmilch. B. z. klin. Tub. 1906, **V**, S. 349. — *Naumann* s. *Croner* u. *Naumann*. — *Neufeld*, Über Händereinigung und Händedesinfektion. D.-med. Woch. 1918, S. 649. — *Nocht*, Über die Verwendung von Carbolseifenlösungen zu Desinfektionszwecken. Zt. f. Hyg. 1889, **VII**, S. 521. — *Noorden*, Über Normalisierung von Desinfektionsmitteln. Desinfektion 1921, Neue Folge, **VI**, H. 2. — *Normann* s. *Heulett* u. *Normann*. — *Nothen*, Beiträge zur bakteriologischen Prüfung von Desinfektionsmitteln. Inaug.-Diss. Bonn 1904. — *Noyes*, Zt. f. physik. Ch. 1902, **XL**, S. 513. — *Nyman* s. *Madsen* u. *Nyman*; *Reymann* u. *Nyman*. — *Ohira*, Über die bactericide Wirkung des Urotropin. Zbl. f. Bakt. 1920, **LXXXV**, S. 63. — *Öhmichen*, Beiträge zur Desinfektionslehre. Arb. a. d. Kais. Ges. 1893, **XI**, S. 275. — *Ohlmacher*, Some suggestions in bacteriologic technic. New York Med. J. 2. März 1895. — *Ohlmüller*: ¹ Versuche über die desinfizierende Kraft der synthetischen Carbonsäure. Arb. a. d. Kais. Ges. 1890, **VI**, S. 89; ² Über die Einwirkung des Ozons auf Bakterien. Arb. a. d. Ges. 1893, **VIII**, S. 229. — *Oker-Blom*: ¹ Über die keimtötende Wirkung des ultraviolett Lichtes im klaren, getrühten und gefärbten Wasser. Zt. f. Hyg. 1913, **LXXIV**, S. 193; ² Über die Wirkungsart ultraviolett Lichtes auf Bakterien. Zt. f. Hyg. 1913, **LXXIV**, S. 242. — *Okolska* s. *Eisenberg* u. *Okolska*. — *Wilh. Ostwald*: ¹ Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physikalischer und chemischer Messungen. Leipzig 1893, **V**, S. 66, 770; ² Lehrbuch der allgemeinen Chemie. 2. Aufl., 1906. — *Wo. Ostwald*: ¹ Versuche über die Giftigkeit des Seewassers für Süßwassertiere. Pflügers A. 1905, **CVI**, S. 568; ² Über die Beziehungen zwischen Adsorption und Giftigkeit von Salzlösungen für Süßwassertiere. Pflügers A. 1907, **CXX**, S. 19. — *Wo. Ostwald* u. *Dernoschek*, Über die Beziehungen zwischen Adsorption und Giftigkeit. Zeitschrift für Chemie und Industrie der Kolloide 1910, **VI**, S. 297. — *Otsuki*: ¹ Inaug.-Diss. Halle 1899; ² Untersuchungen über den Einfluß der Unterlage auf die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegenüber Milzbrandsporen. Hyg. R. 1900, **X**, S. 153. — *Ottolenghi*: ¹ I batteri patogeni in rapporto con disinfettanti. Rosenberg-Sellier, Torino 1899; ² Über das Desinfektionsvermögen des HgCl₂. Desinfektion 1908, **I**, S. 291; 1909, **II**, S. 105; 1910, **III**, S. 73; ³ Experimentelle Untersuchungen über das Desinfektionsvermögen des HgCl₂. Desinfektion 1911, **IV**, S. 65. — *Overton*, Vierteljahrsschrift der naturforschenden Ges. Zürich 1899, **XLIV**, S. 88. — *Pane*, Sulle condizionale, che modificano il potere antisettico di alcune sostanze. Atti della R. Accad. med. di Roma 1890, **II**, S. 5. — *Pannwitz*, Ein neuer bakteriendichter, selbsttätiger, selbstkontrollierender Gefäßverschluß für Sterilisationszwecke. Zbl. f. Bakt. 1893, **XIII**, S. 754. — *Pansini*, Dell'azione della luce solare sui microorganismi. Rivista d'igiene 1889, Ref. Duclaux' Ann. Pasteur 1889, **III**, S. 686. — *Pasteur*: ¹ Études sur les vins etc. Paris 1866; ² Études sur le vinaigre. Paris 1868. — *Patzschke*, Über die Widerstandsfähigkeit von Bakterien gegenüber hoher Temperatur und

das *Lobeksche* Biorisierverfahren. *Zt. f. Hyg.* 1917, **LXXXI**, S. 227. — *Paul* (s. auch *Kroenig u. Paul*): ¹ Entwurf zur einheitlichen Wertbestimmung chemischer Desinfektionsmittel. *Zt. f. angew. Chem.* 1901, S. 333 u. Springer, Berlin 1901; ² Der chemische Reaktionsverlauf beim Absterben trockener Bakterien bei niedriger Temperatur. *Bioch. Zt.* 1910, **XVIII**, S. 1. — *Paul, Bierstein u. Reuß*: ¹ Beitrag zur Kinetik des Absterbens der Bakterien in Sauerstoff verschiedener Konzentrationen und bei verschiedenen Temperaturen. *Bioch. Zt.* 1910, **XXV**, S. 367; ² Beiträge zur Kinetik der Giftwirkung von gelösten Stoffen. *Bioch. Zt.* 1910, **XXIX**, S. 201. — *Paul u. Prall*, Die Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln mit Staphylokokken, die bei der Temperatur der Flüssigkeit in der Luft aufbewahrt wurden. *Arb. a. d. Kais. Ges.* 1907, **XXVI**, S. 129. — *Paul u. Sarway*, Experimentaluntersuchungen über Händedesinfektion. *M. med. Woch.* 1899, S. 1633. 1725; 1900, S. 1006, 1038, 1075; 1901, S. 1107. — *W. L. Pauli s. Grober u. Pauli*. — *Peerenboom s. Rubner u. Peerenboom*. — *R. Pfeiffer u. Friedberger*, *Berl. klin. Woch.* 1901, S. 640. — *Phelps*, The application of certain laws of physical chemistry in the standardisation of disinfectants. *J. of inf. dis.* 1911, **VIII**, S. 27. — *Pitzmann*, Über das desinfizierende Verhalten des Sublimats und Silbernitrats in eiweißhaltigen Flüssigkeiten. *Hygienische Rundschau* 1909, S. 693. — *Ponder s. Woodhead, Ponder u. Walker*. — *Prall s. Paul u. Prall*. — *Procter*, Über die Einwirkung verdünnter Säuren und Salzlösungen auf Gelatine. *Koll.-chem. Beihefte* 1911, **II**, S. 7. — *Proskauer* (s. auch *Fischer u. Proskauer*), Einheitliche Regelung der Prüfungsmethodik für Desinfektionsapparate und -mittel. *Ber. d. XI. Berl. intern. Kongr. f. Hyg. u. Dew.* in Berlin 1907, **II**, S. 973. — *Pulst*, *Jahrb. f. wiss. Botanik* 1902, **XXXVII**, S. 205. — *Ransome u. Foulerton*, Über den Einfluß des Ozons auf die Lebenskraft einiger pathogener und anderer Bakterien. *Zbl. f. Bakt.* 1901, **XXIX**, S. 900. — *Rapp*, Über desinfizierende Wandanstriche. *A. f. Hyg.* 1903, **XVII**, S. 291; Beitrag zur Wertbestimmung chemischer Desinfektionsmittel. *Zbl. f. Bakt.* 1906, **XLI**, S. 126. — *Rasp*, Die Einwirkung der Seifen für sich und in Verbindung mit Phenol auf die Bakterien vom chemischen Standpunkt aus betrachtet. *Zt. f. Hyg.* 1907, **LVIII**, S. 45. — *Regenstein*, Studien über die Anpassung von Bakterien an Desinfektionsmittel. Ein Beitrag zu den Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und physiologischer Wirkung. *Zbl. f. Bakt.* 1912, **LXIII**, S. 281. — *Regnault*, *Mémoires de l'acad. r. et de l'Inst. de France.* 1847, **XXI**. — *Reichel*: ¹ Die Trinkwasserdesinfektion durch H_2O_2 . *Zt. f. Hyg.* 1908, **LXI**, S. 49; ² Zur Theorie der Desinfektion. *Bioch. Zt.* 1909, **XXII**, S. 149; ³ Der Nachweis und die Verbreitung der Milzbrandsporen auf tierischen Rohstoffen. *Zbl. f. Bakt.* 1911, **L**, Anhang S. 83 (s. auch *Gegenbauer u. Reichel*). — *Reichel u. Gegenbauer*, Zur Desinfektion milzbrandiger Felle und Häute. *Zt. f. öff. Ges.* 1916, **IV**, S. 1. — *Reichenbach*: ¹ Die Leistungen der Formaldehyddesinfektion. *Zt. f. Hyg.* 1905, **L**, S. 450; ² Die desinfizierenden Bestandteile der Seifen. *Zt. f. Hyg.* 1907, **LIX**, S. 296; ³ Zur Theorie der Desinfektion. *Zbl. f. Bakt.* 1910, **XLVII**. *Anh. S.* 75; ⁴ Die Absterbeordnung der Bakterien und ihre Bedeutung für Theorie und Praxis der Desinfektion. *Zt. f. Hyg.* 1911, **LXIX**, S. 171. — *Reiter*, Über die Gewinnung resistenter Milzbrandsporen. *A. f. Hyg.* 1920, **LXXXIX**, S. 191. — *Reiter u. Arndt*, Zur Wertbestimmung der Desinfektionsmittel. *D. med. Woch.* 1920, S. 568. — *Reuß s. Paul, Bierstein u. Reuß*. — *Reymann u. Nyman*, Studien über Desinfektion mit besonderem Hinblick auf die Methode von *Krönig u. Paul*, *Zbl. f. Bakt.* 1911, **LVIII**, S. 359. — *Rideal*, Einheitliche Regelung der Prüfungsmethodik für Desinfektionsapparate und Desinfektionsmittel. *Ber. d. intern. Kongr. f. Hyg. u. D. in Berlin* 1907. 1908, **II**, S. 979. — *S. Rideal and E. K. Rideal*, Some remarks on the Rideal-Walker-test and the Rideal-Walker-method. *J. of inf. dis.* 1912, **X**, S. 248. — *Rideal u. Walker*, The standardisation of disinfectants. *J. of Roy. San.-Inst.* 1903, **XXIV**, S. 424. — *Riegel*, Citronensäure und Sonnenstrahlen als Desinfektionsmittel für Trinkwasser für militärische Zwecke. *A. f. Hyg.* 1907, **LXI**, S. 217. — *v. Rigler*, Desinfektion mittels NH_3 -Dämpfen. *Zbl. f.*

Bakt. 1893, XIII, S. 651. — C. Römer, Über Desinfektion von Milzbrandsporen durch Phenol in Verbindung mit Salzen. M. med. Woch. 1898, S. 298. — P. Römer s. Much u. Römer. — Rodet, Expériences sur la valeur antiseptique du savon commun. Remarque sur l'action des antiseptique en général et sur la biologie des Staphylocoque pyogène. Zbl. f. Bakt. 1905, XCVIII, S. 718. — Rogers, An experimental inquiry on the disinfection of floors for plague. J. of hyg. 1902, II, S. 129. — Roth (mit Aufrecht), Die Strahlen mineralischer Lichtsauger als Heil- und Entsaugungsmittel. Zt. f. angew. Ch. 1900, S. 663. — Roth, D. med. Woch. 1885, S. 135. — Rothaß s. Küster u. Rothaß. — Rotter, Zbl. f. Chir. 1888, S. 729. — Roux, De l'action de la lumière et de l'air. Ann. Pasteur 1887, I, S. 445. — Rubner: ¹ Luftbewegung und Wärmedurchgang bei Kleidungsstoffen. A. f. Hyg. 1895, XXV, S. 1; ² Einfluß der Feuchtigkeit auf das Wärmeleitungsvermögen der Kleidungsstoffe. A. f. Hyg. 1895, XXV, S. 29; ³ Zur Theorie der Dampfdesinfektion. Hyg. R. 1898, VIII, S. 721; 1899, IX, S. 321; ⁴ Über das Eindringen der Wärme in freie Objekte und Organteile tierischer Herkunft. A. f. Hyg. 1906, LV, S. 225; ⁵ Untersuchungen über die Erwärmung poröser Objekte durch gesättigte Wasserdämpfe bei künstlich erniedrigter Siedetemperatur. A. f. Hyg. 1906, LVI, S. 209; ⁶ Die wissenschaftlichen Grundlagen einer Desinfektion durch vereinigte Wirkung gesättigter Wasserdämpfe und flüchtiger Desinfektionsmittel bei künstlich erniedrigtem Druck. A. f. Hyg. 1906, LVI, S. 241. — Rubner u. Peerenboom, Beiträge zur Theorie und Praxis der Formaldehyddesinfektion. Hyg. R. 1899, IX, S. 265. — Florence Rumry s. Faustus u. Rumry. — Ruß, Über den Einfluß der Röntgenstrahlen auf Mikroorganismen. A. f. Hyg. 1906, LVI, S. 341. — Saltikow, Über desinfizierende Wandanstriche. Zt. f. Hyg. 1909, LXII, S. 453. — Sambuc, Rev. d'hyg. 1885. — Santori, L'influenza della temperatura sull'azione microbicida della luce. Ann. d'Ist. d'igiene d. U. d. Roma 1890. — Sarway s. Paul u. Sarway. — Saxl: ¹ Über die Verwendung der keimtötenden Fernwirkung des Silbers für die Trinkwassersterilisation. Wr. kl. Woch. 1917, S. 965; ² Über die keimtötende Wirkung von Metallen (oligodynamische Wirkung). Wr. kl. Woch. 1917, S. 414; ³ Die oligodynamische Wirkung der Metalle und Metallsalze. Wr. kl. Woch. 1917, S. 1426. — Scharff, Experiments of disinfection of water with ultra-violet light, with a discussion of the laws of disinfection. J. of onf. dis. 1912, X, S. 305. — Schermann s. Bürgers, Schermann u. Schreiber. — Scheurten, Die Bedeutung des Molekularzustandes der wasserfreien Desinfektionsmittel für ihren Wirkungswert. A. f. exp. Path. u. Pharm. 1896, XXXVII, S. 74. — Scheurten u. Spiro, Die gesetzmäßigen Beziehungen zwischen Lösungssubstanz und Wirkungswert der Desinfektionsmittel. M. med. Woch. 1892, XLIV, S. 4. — Schimmelbusch, Die Durchführung der Asepsis in der Klinik des Herrn Geheimrates v. Bergmann in Berlin 1891. Arb. a. d. chir. Kl. V. — Schneider, Über Desinfektionsmittelprüfung und neuere Desinfektionsmittel. D. med. Woch. 1909, S. 150. — Schneider u. Seligmann, Studien zur Wertbestimmung chemischer Desinfektionsmittel. Zt. f. Hyg. 1908, LVIII, S. 413. — Schoeller u. Schraut, Über die Desinfektionskraft komplexer organischer Quecksilberverbindungen. I. Aromatische Hg-Carbonsäuren. I. Zt. f. Hyg. 1910, LXVI, S. 497; II. Zt. f. Hyg. 1912, LXX, S. 24. — Schraut s. Schöller u. Schraut. — Schreiber s. Bürgers, Schermann u. Schreiber. — Schüder, Über das Hünemannsche Verfahren der Wasserdessinfektion nebst Bemerkungen über die bei der Prüfung derartiger Desinfektionsmittel anzuwendenden Untersuchungsmethoden. Zt. f. Hyg. 1901, XXXIX, S. 379. — Schumburg, Über die Desinfektionskraft der heißen Luft. Zt. f. Hyg. 1902, XLI, S. 167. — Schut, Über das Absterben von Bakterien beim Kochen unter erniedrigtem Druck. Zt. f. Hyg. 1903, XLIV, S. 323. — Schwarz u. Zehner, Über einige biochemische Strahlungsreaktionen. Versuche mit Thorium-X. D. med. Woch. 1912, S. 1776. — Seligmann s. Schneider u. Seligmann. — Seige, Über die desinfizierende Wirkung der Alkoholdämpfe. Arb. a. d. Ges. 1902, XVIII, S. 362. — Setz, Über Händedesinfektion und -desinfektion. Zbl. f. Bakt. 1904, XXXVII, S. 721. — Sitsen, Über den Einfluß des Trocknens auf die

Widerstandsfähigkeit den Mikroben Desinfektionsmitteln gegenüber. Zbl. f. Bakt. 1899, XXVI, S. 65. — *Sonntag*, Über die Bedeutung des Ozons als Desinfiziums. Zt. f. Hyg. 1890, VIII, S. 95. — *Speck*, Hygienische Händedesinfektion. Zt. f. Hyg. 1905, L, S. 502. — *Spilker* u. *Gottstein*, Über die Vernichtung von Mikroorganismen durch die Induktionselektrizität. Zbl. f. Bakt. 1890, IX, S. 77. — *Spirig*, Der Desinfektionswert der Soziodolpräparate nebst Bemerkungen über die Technik der Prüfung der Antiseptica. Zt. f. Hyg. 1893, XIII, S. 15. — *Spiro*, Über physikalische und physiologische Selektion. Straßburg 1897. — *Spiro* s. *Scheurten* u. *Spiro*. — *Spiro* u. *Bruns*, Zur Theorie der Desinfektion. A. f. exp. Path. u. Pharm. 1898, XLI, S. 355. — *Stadler* u. *Kleemann*, Über die Hämolyse von NH₄ und Essigsäure. Bioch. Zt. 1911, XXXVI, S. 321 u. 391. — *Steffenhagen* u. *Wedemann*, Über Wohnungsdesinfektion mit dem KMnO₄- und Autoformverfahren. Arb. a. d. Kais. Ges. 1910, XXXIV, S. 123. — *Steiger* u. *Döll*, Untersuchungen über die Desinfektionskraft des Sublimats. Zt. f. Hyg. 1913, LXXIII, S. 324. — *Stercus*, Bot. Gaz. 1898, XXVI, S. 337. — *Stokvis*, Desinfektion bei künstlich erniedrigtem Kochpunkte unter Anwendung flüssiger Desinfizienzien. Zbl. f. Bakt. 1920, LXXXV, S. 166. — *Strandberg* s. *Jansen* u. *Strandberg*. — *Strebel*: ¹ Untersuchungen über die bactericide Wirkung des Hochspannungsfunklichtes etc. D. med. Woch. 1901, S. 69; ² F. d. Röntg. 1901, IV, S. 25. — *Streck*, Über die oligodynamische Wirkung des Cu auf Bakterien. Hyg. R. 1919, XXIX, S. 685. — *Süpfle*: ¹ Über die Resistenz der Bakterien und ihre experimentelle Prüfung. S.-B. d. Ges. f. Morph. u. Php. München 1916; ² Weitere Untersuchungen über optimale Nährböden zur Nachkultur bei der Prüfung von Desinfektionsverfahren. A. f. Hyg. 1919, LXXXVII, S. 232. — *Süpfle* u. *Dengler*, Die Bedeutung optimaler Nährböden zur Nachkultur bei Prüfung von Desinfektionsverfahren. A. f. Hyg. 1916, LXXXV, S. 189. — *Tamann* s. *Chlopin* u. *Tamann*. — *Tappeiner* s. *Jodlbauer* u. *Tappeiner*. — *Teuscher*, Beiträge zur Desinfektion mit Wasserdampf. Zt. f. Hyg. 1890, IX, S. 492. — *Thiele* u. *Wolf*: ¹ Über die Einwirkung des elektrischen Stromes auf Bakterien. Zbl. f. Bakt. 1899, XXV, S. 650; ² Über die Abtötung von Bakterien durch Licht. A. f. Hyg. 1906, LVII, S. 29. — *Trambusti*, Sperim. 1892, S. 29. — *Traube*, Die physikalische Theorie der Arzneimittel- und Giftwirkung. Bioch. Zt. 1919, XCVIII, S. 177. — *Tyndall*, Essays on the floating-matter of the air. 1882, II, S. 210 u. 337. — *Valentiner* s. *Dorn*, *Baumann* u. *Valentiner*. — *Vogel*, Ein neuer Desinfektionsapparat mit stark strömendem, gespanntem Wasserdampf nebst Bemerkungen über die Bedeutung der Strömung, Spannung, Temperatur des Dampfes bei der Desinfektion. Zt. f. Hyg. 1895, XIX, S. 291. — *Voigt*, Untersuchungen über die bactericide Wirkung der ultravioletten Strahlen. Zt. f. Hyg. 1916, LXXXI, S. 63. — *Vrijheid*, Über den Einfluß der Temperatur auf die Wirkung von Desinfektionsmitteln. Niederl. T. van Genesk. 1896, I, S. 1071; Ref. Baumgartens Jb. 1896, S. 819. — *Wagener*, Zur Hygiene des Fußbodens. Hygienische Rundschau 1903, 1917. — *A. Walker* s. *Rideal* u. *Walker*. — *J. L. Walker* s. *Woodhead*, *Ponder* u. *Walker*. — *Walliczek*, Zur Technik bei Desinfektionsversuchen. Zentralbl. für Bakteriologie 1894, XV, S. 891. — *Wanschkuhn*, Desinfektionsversuche bei Lyssa. Zentralbl. f. Bakt. 1919, LXXXI, S. 318. — *Wedemann* s. *Steffenhagen* u. *Wedemann*. — *Weil*: ¹ Zur Biologie der Milzbrandbacillen: Die Sporenauskeimung. A. f. Hyg. 1901, XXXIX, S. 205; ² Künstliche Herstellung von Sporentestmaterial von einem bestimmten Resistenzgrade gegen strömenden Dampf zur Ermittlung von Desinfektionswerten. Zbl. f. Bakt. 1901, XXX, S. 500. — *Werner*, Die Radiumwirkung auf Infektionserreger und Gewebsinfektion. M. med. Woch. 1905, S. 1625. — *Weyland*, Desinfektionswirkung und Eiweißfällung chemischer Körper. Zbl. f. Bakt. 1897, XXI, S. 789. — *Wiesnegg*, La culture des microbes. La Nature 1885, S. 301, 619. — *Wiesner*, Wirkung des Sonnenlichtes auf pathogene Bakterien. A. f. Hyg. 1907, LXI, S. 1. — *Wilbert*, A review with reports of observations on the influence of Allylalcobol on the germicidal and on the toxic properties of phenol. Publ. Health. Rep. Washington

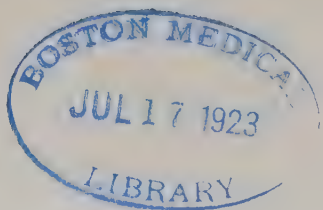
1916, XXXI, S. 1046. — *Wirgin*, Vergleichende Untersuchungen über die keimtötenden und entwicklungshemmenden Wirkungen von Alkoholen der Methyl-, Äthyl-, Propyl- und Amylreihen. Zt. f. Hyg. 1904, XLVI, S. 149. — *Wolf* s. *Thiele* u. *Wolf*. — *Wolffhügel* (s. auch *Koch* u. *Wolffhügel*), Über Desinfektion mittels Hitze. Ges.-Ing. 1887, S. 1. — *Wolffhügel* u. *v. Knorre*, Zu der verschiedenen Wirksamkeit von Carbolöl und Carbolwasser. Mitt. a. d. Kais. Ges. 1881, I, S. 252. — *Wolpert* s. *Mayer* u. *Wolpert*. — *Woodhead, Ponder* u. *Walker*, The Standardisation of Disinfectants. Lanc. 1909, S. 1454, 1516, 1621. — *Wroblewsky*, Zentralblatt für Bakteriologie, II. Abteilung, 1895, I, S. 417. — *v. Wunschheim*, Beeinflußt Glycerin als Lösungsmittel den Desinfektionswert von Antiseptics? Archiv für Hygiene 1909, XXXIX, S. 101. — *Xylander*, Die Desinfektion von Büchern mittels feuchter heißer Luft und gesättigten, niedrig temperierten, unter Vakuum strömenden Formaldehydwasserdämpfen. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 1908, XXIX, S. 288. — *Yersin*, L'action des quelques antiseptiques et de la chaleur sur le bacille de la tuberculose. Ann. Pasteur. 1888, II, S. 60. — *Zehl*, Die Beeinflussung der Giftwirkung durch die Temperatur sowie durch das Zusammengeben von zwei Giften. Inaug.-Diss. (Phil.) Leipzig 1908. — *Zehner* s. *Schwarz* u. *Zehner*. — *Zierler* s. *Lehmann* u. *Zierler*. — *Zikes*, Eine neue Methode zur Prüfung von Desinfektionsmitteln gegenüber Mikroorganismen. Zbl. f. Bakt. II. 1903, VIII, S. 543.

3. u. 4. Abteilung.

Nährböden und Züchtung.

20822 by
A

E. J. 105



Nährböden.

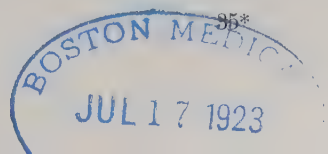
Von Prof. Dr. E. Gildemeister, Berlin-Dahlem.

Mit 10 Textabbildungen.

A. Allgemeine Regeln für die Herstellung von Nährböden.

I. Einleitung.

Das mikroskopische Studium der im menschlichen oder tierischen Organismus, in der Erde, im Wasser oder in der Luft vorkommenden Mikroorganismen gestattet uns, eine Reihe wichtiger Feststellungen bezüglich ihrer Form und ihres Verhaltens gegenüber Farblösungen und sonstigen Reagenzien zu machen. So wertvoll und unerlässlich an sich auch derartige Feststellungen sein mögen, so reichen sie im allgemeinen nicht aus, um eine Bakterienart zu identifizieren. Bei der morphologischen Ähnlichkeit oder Gleichheit zahlreicher Mikroorganismen, bei dem häufig übereinstimmenden färberischen Verhalten genügt die mikroskopische Betrachtung nicht, um die einzelnen Arten unterscheiden zu können. Die genaue Bestimmung einer Bakterienart läßt sich mit Sicherheit nur erreichen, wenn wir sie von ihrem natürlichen Nährboden, ihrer Fundstätte, loslösen und auf künstlichen Nährböden in Reinkultur darstellen. In einer Anzahl von Fällen treffen wir allerdings bereits am Fundorte Reinkulturen von Mikroorganismen, d. h. nur Vertreter ein und derselben Art, an. Alsdann ist unsere Aufgabe, diese natürliche Reinkultur auf geeignete künstliche Nährböden zu übertragen und weiterzuzüchten, verhältnismäßig einfach. Schwieriger gestaltet sich jedoch die Aufgabe, wenn die Bakterien in dem Ausgangsmaterial nicht in Reinkultur vorhanden sind, sondern, wie dies zumeist der Fall zu sein pflegt, aus einem Gemisch verschiedener Arten bestehen. In diesen Fällen ist die Züchtung auf künstlichen Nährböden unumgänglich, um zu Reinkulturen der einzelnen Arten zu gelangen, aus denen das Bakterien-gemisch sich zusammensetzt. Erst wenn wir im Besitze von Reinkulturen auf künstlichen Nährböden sind, sind wir in der Lage, eine Bestimmung der Bakterienarten, d. h. eine bakteriologische Diagnose, vorzunehmen. Erst die Reinkultur ermöglicht es uns, das biologische und immunologische Verhalten der Bakterienarten systematisch zu prüfen und festzulegen. Die künstliche Züchtung der Bakterien bietet uns weiterhin den



unschätzbaren Vorteil, die Bakterien jederzeit in handlicher Form für den Reagensglas- oder Tierversuch zur Stelle zu haben.

Die Zeit vor *Koch* bediente sich ausschließlich der flüssigen Nährböden, die wohl eine Züchtung von Bakterien gestatten, aber eine Trennung der verschiedenen Bakterienarten, die Gewinnung von Reinkulturen, kaum oder jedenfalls nicht mit Sicherheit ermöglichen. Erst die Einführung und systematische Anwendung fester, durchsichtiger Nährböden zum Zwecke der Isolierung der Bakterienarten durch *R. Koch* im Jahre 1881 schuf die Grundlage der modernen Bakteriologie und bewirkte ihre schnelle, glänzende Entwicklung.

Die Herstellung von Bakteriennährböden ist eine Kunst, vergleichbar der Kochkunst im Haushalte, die fleißig geübt werden muß, um diejenigen, für die die Nahrung bestimmt ist, zufriedenzustellen. Auch die Bakterien, so anspruchslos sie in ihrem Nahrungsbedürfnis zu sein scheinen, nehmen nicht jede Nahrung, die ihnen geboten wird, sondern verlangen je nach ihrer Art verschieden zusammengesetzte und zum Teil recht kompliziert aufgebaute Nährböden. Durch das Mischen der gleichen Zutaten wird nicht immer eine Speise von gleich guter Beschaffenheit. Es kommt auf das Können des Koches und seine Erfahrungen an, die er auf dem Gebiet der Kochkunst gesammelt hat. Nicht alle Handgriffe und kleinen Kunstgriffe finden sich in einem Kochbuch, und so kann auch der Bakteriologe nicht erwarten, alle Nährbodenvorschriften bis ins kleinste ausgearbeitet zu finden. Auch hier kann nur durch fleißige praktische Betätigung die nötige Erfahrung gewonnen werden. So nutzbringend die Mitwirkung eines geschickten Gehilfen bei der Bereitung der Nährböden auch sein mag, so darf es doch nie dahin kommen, daß der Bakteriologe aus Unkenntnis der Dinge in völlige Abhängigkeit des Gehilfen gerät. Gute Kenntnisse auf dem Gebiete der Nährbodenbereitung sind heute umsomehr erforderlich, als infolge der Not der Zeit auch Mangel an Rohstoffen für die Ernährung der Bakterien eingetreten ist und wir öfter, als uns lieb ist, gezwungen sind, nach Ersatzmitteln Umschau zu halten.

Die Gewinnung und Erhaltung von Reinkulturen auf künstlichen Nährböden haben zur Voraussetzung, daß in den Nährböden und in den Gefäßen, in denen die Züchtung vor sich gehen soll, andere Mikroorganismen nicht vorhanden sind. Es müssen daher Nährböden und Gefäße zuvor keimfrei gemacht werden. Das geschieht bei Nährböden vornehmlich durch Anwendung der feuchten Wärme, u. zw. in Form des strömenden oder gespannten Dampfes, während die Sterilisation der Glasgefäße im Heißluftsterilisator vor sich geht. Bezüglich näherer Einzelheiten sei auf das Kapitel „Sterilisation“ verwiesen. Bei der Sterilisation der Nährböden ist darauf zu achten, daß sie durch die dabei notwendige Erhitzung in ihrer chemischen Zusammensetzung und, falls es sich um feste Nährböden handelt, außerdem in ihrer Konsistenz keinen oder möglichst geringen Schaden erleiden. Je schonender die Sterilisation eines Nährmediums vorgenommen wird, umso brauchbarer pflegt es für die Bak-

terienzüchtung zu sein. Infolgedessen ist bei Beschreibung eines Nährbodens die Angabe über Art und Dauer der Sterilisation unerlässlich.

Bereitung und Aufbewahrung von Nährböden erfolgen hauptsächlich in Glasgefäßen. Jedoch ist nicht jedes Glas für diesen Zweck, insbesondere für die Bereitung, geeignet. Ein für bakteriologische Arbeiten brauchbares Glas muß wegen der häufigen Sterilisationen bei recht hohen Temperaturen (160° und darüber) gegen Temperaturschwankungen sehr widerstandsfähig sein; es darf ferner von Wasser und Chemikalien nur wenig angegriffen werden und darf insbesondere kein Alkali abgeben. Von der Alkaliabgabe kann man sich überzeugen, indem man die Glasgefäße mit einer wassergesättigten, ätherischen Eosinlösung anfüllt, die alsbald die Wandung der Gläser je nach der Güte weniger oder mehr rot färben wird (*Hesse*). Ein Glas, das bakteriologischen Anforderungen in weitestem Maße genügt, wird von der Firma Schott & Co. in Jena unter dem Namen „Geräteglas“ hergestellt.

In der Nährbodenküche haben Ordnung und Sauberkeit zu herrschen. Im Gebrauch gewesene Geräte sind sofort wieder zu reinigen und an sauberer Stelle aufzubewahren. Die Anwendung von chemischen Desinfektionsmitteln in der Nährbodenküche hat unter allen Umständen zu unterbleiben. Sie ist auch nicht erforderlich, da die im Laboratorium infizierten Gegenstände nur nach erfolgter Desinfektion und Reinigung in die Nährbodenküche zurückgelangen dürfen und chemische Desinfektionsmittel andererseits zur Sterilisation der anzufertigenden Nährböden, wenn man vom Chloroform absieht, im allgemeinen nicht benötigt werden. Hände, die zuvor in einer Sublimat- oder sonstigen Desinfektionslösung desinfiziert worden sind, sind gründlich mit Wasser abzuspülen, bevor sie Geräte und Substanzen, die zur Nährbodenbereitung dienen sollen, berühren. Besonders nachteilig wirkt Sublimat; bereits geringe Spuren, die durch die Hände oder irgend ein Gerät (Meßzylinder, Kolben) in den Nährboden geraten, können das Bakterienwachstum nachteilig beeinflussen.

II. Neutralisieren und Alkalisieren der Nährböden.

Das Wachstum der Bakterien ist in hohem Grade abhängig von der Reaktion des Nährbodens. Sie gedeihen auf einem sauer reagierenden Nährboden im allgemeinen nicht; die Mehrzahl von ihnen entwickelt sich nur bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion. Da nun die Nährbodengemische, soweit sie Fleischwasser als Grundlage haben, zumeist eine saure Reaktion aufweisen, so sind sie vor ihrer Verwendung zu neutralisieren und alkalisieren.

Das geschah bisher in der Regel unter Benutzung von *Lackmus* als Indicator. Zu dem flüssigen oder flüssig gemachten Nährboden wird unter gründlichem Umschütteln mit der Pipette tropfenweise Normalnatronlauge hinzugesetzt, bis der Lackmusneutralpunkt erreicht ist, d. h.

bis blaues Lackmuspapier sich nicht mehr rötet und Lackmusneutralpapier unverändert bleibt. Bei der Alkalisierung des Nährbodens wird von dem Lackmusneutralpunkt ausgegangen; sie richtet sich nach dem Zweck, dem der Nährboden dienen soll. In den meisten Fällen wird es genügen, wenn man zu 1 l eines lackmusneutralen Nährbodens 15 cm³ 10%ige Sodalösung hinzusetzt.

Nach E. Zettnow soll für die anfängliche Neutralisierung nicht Soda genommen werden, weil die freiwerdende Kohlensäure die Tüpfelreaktion auf Lackmuspapier beeinträchtigen würde; umgekehrt soll bei der Alkalisierung der neutralisierten Lösung keine Natronlauge verwendet werden, weil sie mit den stickstoffhaltigen Stoffen der Lösung unerwünschte und unkontrollierbare Verbindungen eingehen könnte, was bei Soda nicht der Fall ist. Sieht man von der Feststellung des Lackmusneutralpunktes ab, so braucht Neutralisierung und Alkalisierung nicht getrennt zu werden; infolgedessen wird die Verwendung von zweierlei Alkalien nicht erforderlich.

Für manche Zwecke ist es unerlässlich, die Reaktion genauer herzustellen. In diesen Fällen ist die Menge Alkali oder Säure durch Titration zu bestimmen, welche das betreffende Nährmedium von seiner ursprünglichen Reaktion aus bis zu seinem Phenolphthaleinpunkt braucht. Phenolphthalein ist das empfindlichste Reagens auf Säuren und reagiert deshalb auch auf die geringsten Spuren Kohlensäure; Carbonate lassen sich mit ihm nur titrieren, wenn durch Kochen alle freigewordene Kohlensäure ausgetrieben ist. Die Austitrierung geschieht von einer kleinen Menge, von der dann auf die Gesamtmenge umgerechnet wird, in folgender Weise: 5 cm³ des Nährbodens werden mit 45 cm³ destillierten Wassers verdünnt und einige Minuten aufgeköcht. Hierauf werden einige Tropfen einer 1%igen alkoholischen Phenolphthaleinlösung hinzugesetzt; Rotfärbung zeigt alkalische Reaktion, Farblosigkeit saure Reaktion an. Alsdann wird durch vorsichtige Titration mit $\frac{n}{10}$ -Natronlauge oder $\frac{n}{10}$ -Salzsäure genau die Alkali- bzw. Säuremenge bestimmt, welche zur Neutralisierung von 5 cm³ Nährboden erforderlich ist. Man kontrolliert nochmals mit $\frac{n}{100}$ -Lösung, rechnet auf die gesamte Nährbodenmenge um und setzt unter Berücksichtigung der Tatsache, daß der Phenolphthaleinpunkt eine stark alkalische Reaktion gegen Lackmuspapier bedeutet, je nach dem gewünschten Alkaligrad die Hälfte oder zwei Drittel der berechneten Menge zu dem Gesamtnährboden hinzu.

Zur Titrierung von Carbonaten und von anorganischen Verbindungen ist Methylorange besser geeignet. Es wird in heißem destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 5000 eingesetzt und nach dem Erkalten filtriert. Auch bei der Titrierung mit Methylorange empfiehlt es sich, die Flüssigkeit vor der Annahme des Endtiters zu kochen, da die freiwerdende Kohlensäure doch nicht ganz ohne Einfluß ist, und dann allenfalls noch bis zum Ende zu titrieren. Man verwende die geringst mögliche Menge des Indicators (Heim).

Neben Lackmus verwandten *Schneider* und *Seligmann* bei der Neutralisation von Nährböden einen gelben, sehr alkaliempfindlichen Farbstoff, Brillantgelb, als Indicator. Die Lösung dieses Farbstoffes oder damit getränktes Papier wird durch geringe Mengen sowohl freien wie kohlensauren Alkalis orange und durch größere Mengen intensiv rot gefärbt. Sie stellten sich ein Brillantgelbpapier her, das bei seiner Anwendung zum Alkalisieren der Nährböden vor Lackmus den Vorzug haben soll, daß es seinen Alkaligehalt deutlicher als letzteres anzeigt und der Laboratoriumsatmosphäre gegenüber nicht so empfindlich wie Lackmus ist.

Exaktere und wesentlich zuverlässigere Resultate als die zuvor genannten Methoden liefert die im Auslande, insbesondere in England und Amerika, in die Nährbodentechnik in den letzten Jahren eingeführte Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration. In Deutschland hat *Michaelis* sich um die Einführung dieses Verfahrens und um die Ausarbeitung einer den Verhältnissen der Praxis Rechnung tragenden einfachen Methode erfolgreich bemüht. In unseren Laboratorien findet bereits seit Monaten die Einstellung der Reaktion der Nährböden ausschließlich und zu aller Zufriedenheit nach den Vorschriften von *Michaelis* statt. Mit Rücksicht auf die Bedeutung, die diesem Verfahren zweifellos zukommt, sei auf dasselbe ausführlich eingegangen.

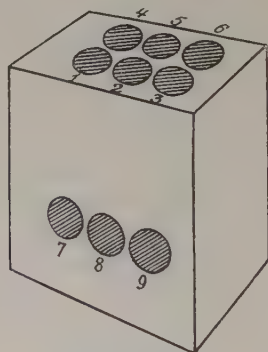
Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß man mit einem einfarbigen Indicator (z. B. Phenolphthalein, Nitrophenol, nicht aber Lackmus, Methylorange) die in der zu untersuchenden Lösung vorhandene Farbtiefe im Verhältnis zu der bei Alkaliüberschuß überhaupt erreichbaren maximalen Farbtiefe bestimmt. Als Indicatoren werden solche angewandt, welche von farblos nach gefärbt (gelb, rot) umschlagen.

Bei der Anwendung der Methode auf Nährbouillon ist nun die Schwierigkeit zu überwinden, daß die Erkennung der Farbtiefe durch die Eigenfarbe der Bouillon gestört wird. Diese Schwierigkeit kann aber leicht durch die Kombination zweier Kunstgriffe überwunden werden. Der erste ist die Verdünnung der Bouillon mit 0·85%iger Kochsalzlösung. Da nämlich die Nährböden infolge ihres Gehaltes an Pepton und Phosphaten den Charakter von Pufferlösungen haben, kann man sie verdünnen, ohne daß sich p_H ändert. Als Verdünnungsflüssigkeit eignet sich am besten eine etwa 0·85%ige Kochsalzlösung. Durch diese wird bewirkt, daß beim Verdünnen der Gesamtsalzgehalt der Lösung annähernd gleichbleibt.

Aber die Verdünnung vermindert nur die Farbe, beseitigt sie nicht völlig. Es ist noch ein zweiter Kunstgriff erforderlich, das *Walpolesche* Prinzip. Dieses Prinzip, das 1910 von *Walpole* beschrieben wurde, hat in England und Amerika eine weite Verbreitung gefunden; in Deutschland ist es noch wenig angewendet worden, mit Ausnahme von *Lüers*, der es in sehr zweckmäßiger Weise bei der alkalimetrischen Titration gefärbter Flüssigkeiten, wie Bier u. s. w., benutzt hat.

Für den vorliegenden Zweck eignet sich vorzüglich eine Form des „Komparators“, die *Hurwitz, Meyer* und *Ostenberg* angegeben haben. Das von *Michaelis* benutzte Modell hat folgende Form: Ein Holzblock in Form eines Parallelepipeds, 8·5 cm hoch, 9 cm breit und 4·5 cm tief, wird zylindrisch (s. Fig. 135) ausgebohrt; die Löcher 1—6 sind in zwei Reihen, 1—3 und 4—6 hintereinander angeordnet. Die Löcher sind zylindrisch bis zu einer Tiefe von 8·5 cm eingebohrt und sind so breit, daß ein gewöhnliches Reagensglas eben gerade bequem in sie hineingesteckt werden kann. Durchmesser 1·75 cm. Die Löcher 7—9 sind senkrecht durch den ganzen Holzblock gebohrt und überkreuzen je ein vorderes und hinteres der Reagensglaslöcher. Ihr Durchmesser ist etwas kleiner als der der anderen, 1·3 cm. Sie sind zum Durchblicken bestimmt; man blickt durch jedes Loch durch 2 Reagensgläser hintereinander. Der

Fig. 135.



Komparator.

ganze Kasten, besonders die Innenseite der Löcher, wird geschwärzt. Der Apparat ist von der Firma E. Leitz in Berlin, Luisenstraße 45, erhältlich.

Die Ausführung der p_H -Bestimmung gestaltet sich folgendermaßen: Zunächst sucht man sich eine Reihe von Reagensgläsern aus, welche möglichst genau gleiches Volumen haben, indem man eine Reihe von Reagensgläsern mit je 10 cm³ Wasser füllt und diejenigen mit gleichem Niveaustand aussucht. Nun steckt man ein Reagensglas in Loch 2 und füllt 2 cm³ Bouillon und 4 cm³ 0·85%ige Kochsalzlösung ein. Dazu gibt man eine bestimmte Menge m-Nitrophenollösung (0·3%ige Lösung), welche geeignet ist, eine für die Abschätzung angenehme Farbtiefe zu erzeugen. In der Regel ist 1 cm³ die geeignete Menge. In das Loch 3 füllt man 2 cm³ Bouillon, 4 cm³ NaCl-Lösung und dann noch so viel NaCl-Lösung, als in dem Glas Nr. 2 hinzugefügt worden war, also 1 cm³. Das Loch 6 ist für die verschiedenen Indicatorverdünnungen bestimmt. Diese stellt man auf folgende Weise her: Man verdünnt in einem Meßzylinder 8—10 cm³ n-NaOH auf 200 cm³ mit destilliertem Wasser. Von dieser Lauge mischt man 9 cm³ mit 1 cm³ m-Nitrophenollösung. Von

dieser Indicatorverdünnung gibt man 1 cm^3 in ein Reagensglas in Loch 6 und füllt mit der verdünnten Lauge bis zu dem Volumen des Glases 2 bzw. 3 auf. Nun blickt man durch die Löcher 8 und 9, indem man das Loch 7 mit dem Daumen verschließt und als Griff benutzt. Man blickt entweder gegen eine breite, gleichmäßige Himmelsfläche oder gegen einen reinen, weißen Bogen Schreibpapier, der auf dem Tisch liegt, noch besser gegen eine von diffusem Himmelslicht beleuchtete Mattscheibe. Je nach dem Befunde wechselt man das Glas Nr. 6 gegen ein anderes aus, welches bei gleichem Gesamtvolumen eine andere Menge Indicator enthält, bis man diejenige Indicatormenge gefunden hat, welche Farbgleichheit ergibt. Es ist sehr zu empfehlen, eine passend gewählte durchsichtige Blauscheibe vor die oben erwähnte Mattscheibe zu setzen. Hierdurch werden die Quantitätsunterschiede der verschiedenen Gelbtöne in Farbqualitätsunterschiede, von Blau über Grün nach Gelb, umgewandelt. Diese faßt das Auge müheloser auf. Der optische Vorteil der zweifarbigem Indicatoren wird durch diesen Kunstgriff auch auf die einfarbigen Indicatoren übertragen. Der nach *Michaelis* angefertigte Komparator trägt eine einfache Schiebevorrichtung zum Vorschalten der Matt- und Blauscheibe. Die Löcher 1 und 4 sind dazu da, um auf Wunsch ebenso wie die Löcher 3 und 6 benutzt zu werden. Man kann so gleichzeitig zwei verschiedene Indicatormengen mit der Bouillon vergleichen.

Zur Messung von Nährböden kommt man allein mit m-Nitrophenol aus. Man kann nun nach *Michaelis* die Methode noch wesentlich einfacher dadurch gestalten, daß man die Indicatorverdünnungen nicht jedesmal frisch bereitet, sondern eine kleine Serie vorrätig hält. Die Verdünnungen sind bei geeigneter Herstellungs- und Aufbewahrungsweise sehr lange haltbar. Als Verdünnungsflüssigkeit benutzt man statt der schlecht haltbaren Lauge eine 0.1%ige n-Sodalösung. Diese Lösungen werden in folgender Weise hergestellt. Man bereitet sich zunächst eine 10fache Verdünnung der 0.3%igen m-Nitrophenollösung in 0.1%iger n-Sodalösung. Von dieser gibt man in einer Reihe von 9 Reagensgläsern

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
cm^3	0.27	0.43	0.66	1.0	1.5	2.3	3.0	4.2	5.2

und füllt jedes mit der Sodalösung auf 7 cm^3 auf. Man verschließt die Gläser mit einem Korken und Paraffin und hält sie bei Nichtbenutzung stets im Dunkeln. Dann sind sie unverändert haltbar.

Eine p_{H} -Bestimmung in Bouillon besteht nun in folgenden Handgriffen:

1. In das Loch Nr. 2 des Komparators stellt man ein Reagensglas mit 2 cm^3 Bouillon, 4 cm^3 NaCl-Lösung und 1 cm^3 der 0.3%igen Stammlösung des m-Nitrophenols.

2. In das Loch Nr. 3 bringt man ein Glas mit 2 cm^3 Bouillon + 5 cm^3 NaCl-Lösung.

3. In das Loch Nr. 5 bringt man ein Glas mit beliebig viel Wasser.

4. Man probiert aus, welche der obigen 9 Indicatorverdünnungen man in das Loch Nr. 6 stecken muß, damit Farbgleichheit entsteht, unter Benutzung der Mattscheibe und Blauscheibe.

Die 9 Röhrchen geben folgende p_H an:

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
p_H	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2	8.4

Mit diesen p_H -Angaben kann man die neun aufzubewahrenden Röhrchen gleich etikettieren.

Die ganze Bestimmung ist auf diese Weise in einer Minute ausgeführt und leistet, wie ich bestätigen kann, an Genauigkeit alles, was praktisch erforderlich ist. Sie kann ebenso auch für Agar und Gelatine angewendet werden.

Die übliche Alkalisierung von Bouillon mit Sodalösung ist nach *Michaelis* nicht gerade die geeignete, wenn es sich darum handelt, eine Bouillon von scharf eingestelltem p_H herzustellen. Bei dem p_H der Bouillon verwandelt sich Soda in ein Gemisch von Natriumcarbonat und freier Kohlensäure. Carbonathaltige Puffer sind aber wegen der Flüchtigkeit der CO_2 nicht gerade zur genauen und haltbaren Einstellung von p_H zu empfehlen. *Michaelis* schlägt deshalb folgendes Verfahren vor, um Bouillon von genau definiertem p_H zu erhalten. Von den 5 g NaCl, die man nach der gewöhnlichen Vorschrift auf 1 l Bouillon hinzugibt, ersetzt man 2 g durch gewöhnliches, käufliches (sekundäres) Natriumphosphat. Nach dem Sterilisieren korrigiert man dann die gewünschte Reaktion durch tropfenweisen Zusatz von gewöhnlicher, starker offizineller NaOH bzw. HCl. Eine so eingestellte Bouillon ändert ihre Alkalität beim weiteren Sterilisieren nicht mehr.

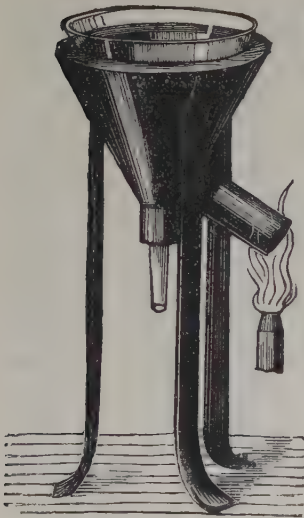
III. Filtration der Nährböden.

Nährböden, die klar und durchsichtig sein sollen, werden filtriert. Die Filtration von Nährbouillon und Nährgelatine erfolgt durch Filtrierpapier, indem man sich aus dem Papier ein doppeltes Faltenfilter herstellt. Hierbei ist zu beachten, daß das Filter den Trichterrand nicht überragt. Das Filter wird zuvor mit destilliertem Wasser angefeuchtet. Die gefährdetste Stelle des Filters, d. h. diejenige Stelle, die beim Filtrieren am ehesten einreißt, ist die Filterspitze. Die Flüssigkeit ist daher vorsichtig aufzugießen; am zweckmäßigsten geschieht dies in der Weise, daß man die Flüssigkeit an einem Glasstabe entlang auf die Filterwand, nicht auf die Filterspitze fließen läßt. Letztere kann man dadurch verstärken, daß man eine kleine, siebartig durchlöchernte Trichtereinlage aus Porzellan zwischen Trichter und Filterspitze einlegt. Stets soll die ganze Menge der zu filtrierenden Lösung auf einmal auf das Filter gegeben werden; die ersten durchgelaufenen Mengen sind immer wieder rasch auf das Filter zurückzugießen, bis man an der völligen Klarheit

des Filtrats bemerkt, daß die Filterporen bis oben hin verlegt sind (*Heim*). Ob eine Nährlösung völlig klar durchfiltriert ist, läßt sich am besten erkennen, wenn man das Glasgefäß auf bedrucktes Papier stellt oder das Filtrat aus größerer Entfernung gegen einen dunklen Hintergrund betrachtet.

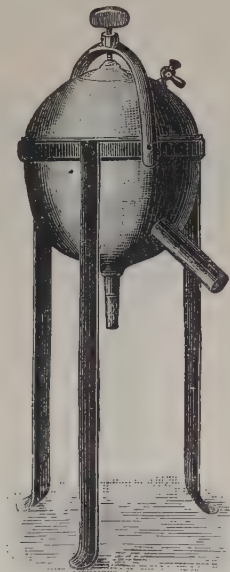
Gelatine filtriert im allgemeinen durch Papier auch bei Zimmertemperatur mit ausreichender Schnelligkeit. Zur Beschleunigung des Verfahrens kann man sie auch in einem Dampftopf oder in einem Heißwassertrichter (s. Fig. 136) vornehmen. Ein solcher Heißwassertrichter, von dem es verschiedenartige, im Prinzip aber übereinstimmende

Fig. 136.



Heißwassertrichter.

Fig. 137.



Dampftrichter nach Unna.

Ausführungen gibt, besteht aus einem doppelwandigen Trichter; in der Doppelwand befindet sich Wasser, das durch eine Heizvorrichtung erneuert werden kann. Dem gleichen Zweck dient auch der von *Unna* angegebene, wohl aber kaum noch angewandte Dampftrichter (s. Fig. 137), bei dem man unter erhöhtem Druck filtrieren kann. Er besteht aus einer kupfernen Hohlkugel mit Ventil, deren oberes Segment abhebbar ist. Im Innern sitzt ein nach außen mündender Metalltrichter, der mit dem verflüssigten Nährmedium gefüllt wird. Die Erhitzung erfolgt von außen. Das Wasser befindet sich zwischen äußerem Trichter und innerer Kugelwand. Mit diesem Trichter kann man nach *Unna* viermal so schnell als gewöhnlich filtrieren.

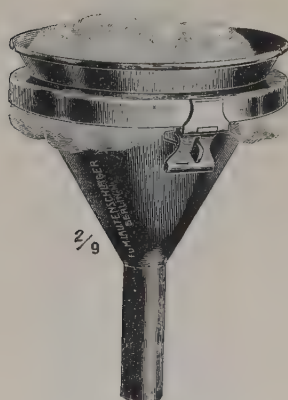
Die Filtration von Agar gestaltet sich wesentlich schwieriger. Will man durch Papier filtrieren, so muß wegen der bei Zimmertemperatur

bald erfolgenden Erstarrung des Nährbodens im Filter die Filtration oft stundenlang im Dampftopf oder im Heißwassertrichter erfolgen; unter dieser langen Erhitzung kann die Beschaffenheit der Agarnährböden leiden.

Es empfiehlt sich daher, Agar durch entfettete weiße Watte zu filtrieren; die Filtration geht hierbei so rasch vor sich, daß ein Heißwassertrichter nicht unbedingt erforderlich ist. Heim gibt für die Filtration durch Watte folgende Vorschrift:

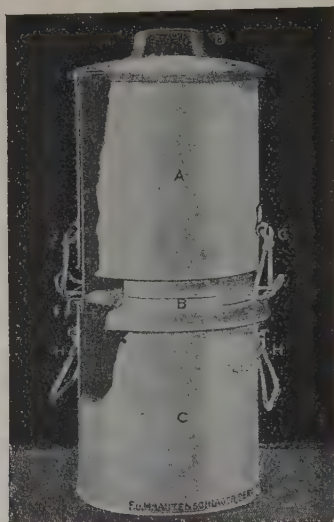
Für kleinere Mengen bis zu 1 l genügt ein Wattebüschchen von etwa 1 g, als Stütze dient ein engmaschiges, gebogenes Drahtnetz, das

Fig. 138.



Filtriertrichter nach Conradi.

Fig. 139.



Schnellfiltrierapparat nach v. Drigalski.

von der Watte umhüllt so in den Trichter gelegt wird, daß die Flüssigkeit nicht unfiltriert daneben vorbeilaufen kann. Der Trichter mit dem von Watte umgebenen Drahtnetz soll vorher in Dampf gehalten werden, wodurch die Watte geeigneter zur Filtration wird. Während der Agar aufgegossen wird, drückt man mit einem Glasstab leicht auf die Mitte des Wattefilters, damit es von der Flüssigkeit nicht gehoben werden kann.

Für größere Mengen kann eine durchlochte Porzellanscheibe von etwa 6—7 cm Durchmesser in einen größeren Trichter gelegt werden, nachdem auch sie zuvor, namentlich auch am Rande, mit Watte umgeben worden ist. Außerdem wird hier noch eine Lage Watte so darüber gebreitet, daß sie die gesamte Innenwand des Trichters bekleidet und oben über seinen Rand hinausragt. Dieses Filter wird ebenfalls vor dem Gebrauch etwa eine Stunde im Dampf gehalten.

Babucke geht in der Weise vor, daß er entfettete Watte in Wasser zunächst einweicht und alsdann in vierfacher Lage in einen Zinktrichter von 21 cm Durchmesser und 3 cm Halsweite preßt, so daß eine konkave Fläche entsteht und die Watte über den Trichterrand hinausragt.

Der von *Conradi* angegebene Trichter besteht aus einem vernickelten Trichter mit abhebbaarem Metallkreuz, auf dem die Watteeinlage mittels eines durch Scharnier und Vorleger befestigten Überfallrahmens festgehalten wird (s. Fig. 138).

Der Schnellfiltrierapparat nach *v. Drigalski* besteht aus drei ineinander passenden Emailtöpfen mit siebförmig gelochten Böden (s. Fig. 139). Kochen des Agars und Filtration, die gleichfalls durch Watte erfolgt, geschieht in demselben Apparate. Da die Einrichtung auch mit einfachem Wasserbad ohne Dampftopf anzuwenden ist, eignet sie sich besonders für fliegende Laboratorien.

Kasperek benutzt zur Agarfiltration einen elektrisch geheizten Trichter, der folgende Konstruktion besitzt: Ein Glastrichter wird von mehreren durch Wasserglas zusammengehaltenen Lagen von Asbestpapier umgeben, zwischen denen 10 m 0.3 mm starker Nickelindraht laufen.

Schließlich sei noch das Verfahren von *Bissérié* erwähnt, der das Vakuum benutzt, das bei der Kondensation von Dampf entsteht, um die Agarlösung durch Filtrierpapier zu treiben, das zwischen zwei Stoffstücken gehalten wird.

IV. Klärung der Nährböden.

Trübungen, die bei oder nach der Filtration eines Nährbodens auftreten, sind zwar ohne Einfluß auf das Wachstum, stören jedoch unter Umständen die Untersuchung der auf solchen Nährböden gewachsenen Bakterien derart, daß ihre Verwendbarkeit ausgeschlossen ist. Derartige Trübungen sind durch mehrmalige Filtration nicht zu beseitigen. Es gelingt dies aber, wenn man in das kalte oder mindestens auf 50° abgekühlte, flüssige Nährmedium Eiweiß einrührt und alsdann aufkocht. Durch die hierbei entstehenden Gerinnungen werden die Trübungen mit entfernt. Die Klärung gelingt jedoch nicht in allen Fällen; die Trübungen können unter Umständen durch den Eiweißzusatz noch verstärkt werden. Nach *Heim* ist daher jede Nährflüssigkeit, bei der man eine Klärung beabsichtigt, im Reagensglasversuch darauf zu prüfen, ob sie die Klärung überhaupt verträgt. Zeigt der Versuch, daß dies nicht der Fall ist, so muß man auf die Eiweißklärung verzichten; es ist dann in der Weise zu verfahren, daß bis zum Phenolphthaleinpunkt oder ein wenig darüber hinaus alkalisiert, noch einmal gekocht und hierauf filtriert wird; das Filtrat läuft klar ab. Zeigt der Vorversuch, daß eine Klärung mittels Eiweiß möglich ist, kann sie angewendet werden.

Klärung mittels Hühnereiweiß: Das Weiße eines Hühnereies, das zur Klärung von 2 l Nährboden (Nährbouillon, Nährgelatine, Nähragar) reicht, wird mit der doppelten Menge kalten Wassers in einer gut verschlossenen Flasche tüchtig geschüttelt und zu der kalten oder mindestens auf 50° abgekühlten Nährlösung unter kräftigem Umrühren hinzugesetzt. Alsdann wird das Ganze im Dampftopf zum Sieden gebracht und hierauf filtriert.

Klärung mittels Albumen ovi siccum in Pulverform. Man rechnet auf 1 l Nährlösung 8 g Eiweiß. Die Aufschwemmung des getrockneten und pulverisierten Hühnereiweißes erfolgt in der Reibschale unter Zusatz der 10fachen Menge destillierten Wassers. Im übrigen verfährt man wie bei der Klärung mittels Hühnereiweiß.

Klärung mittels Blutserum. Da Hühnereier sowohl wie Albumen ovi siccum mit Rücksicht auf die Ernährungslage zweckmäßig für die menschliche Ernährung vorbehalten bleiben müssen, außerdem auch infolge ihres hohen Preises die Nährböden unnötig verteuern würden, so ist die Klärung möglichst mittels Blutserum vorzunehmen. 50—60 cm³ Blutserum enthalten ungefähr 8—10 g Eiweiß; sie genügen zur Klärung eines Liters Nährlösung. Die Art des Blutserums ist gleichgültig.

Klärung mittels Tierkohle. Als Ersatz von Eiereiweiß wird von *Gertrud Dietel* Tierkohle empfohlen. Sie setzt zu 1 l Nährbouillon 10 g Tierkohle und schüttelt kräftig um. Nach einigen Stunden wird durch ein gewöhnliches Faltenfilter filtriert; da das erste Filtrat meist noch nicht klar durchläuft, muß so lange filtriert werden, bis die Bouillon ganz klar wird. Bei Gelatine- und Agarnährböden wird in ähnlicher Weise verfahren; nur muß hier die Tierkohle mit dem Nährboden zunächst aufgekocht werden.

Klärung mittels Bolus alba. *Hopffe* klärt mittels Bolus alba, indem er zur siedenden Nährlösung pro Liter 5 g zusetzt, gut umrührt und noch einige Minuten sieden läßt; hierauf wird filtriert.

V. Abfüllen der Nährböden.

Zum Abfüllen versieht man einen Trichter unten mit einem Stück Gummischlauch, bringt in diesen ein kurzes Glasröhrchen, auf den Trichter eine Glasschale als Deckel und sterilisiert alles zusammen im Dampftopf. Mit Hilfe dieses Apparates, auf dessen Gummischlauch man einen Quetschhahn klemmt, füllt man die gewünschte Menge schätzungsweise in die Röhrchen. Zweckmäßiger ist es, wenn man sich zum Abfüllen von Nährböden in Reagensgläser einer Abfüllvorrichtung, die ein genaues Abmessen der Flüssigkeiten gestattet, bedient. Es genügt eine einfache Bürette oder ein einfacher Abfülltrichter mit genügendem Fassungsraum, wie sie in Fig. 140 u. 141 abgebildet sind. Großer Verbreitung erfreut sich der von *Treskow* angegebene Abfülltrichter

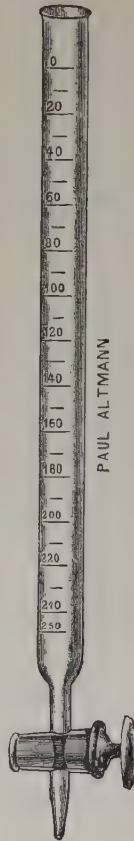
(s. Fig. 142). Er besteht aus einem Trichter mit durchbohrtem Hahn und seitlichem graduirtem Meßgefäß. Der Apparat wird zuvor im Heißluftsterilisator oder im Dampftopf sterilisiert, so daß ein keimfreies Abfüllen der Nährböden möglich ist, was insbesondere für solche Nährmedien, die nach dem Abfüllen nicht mehr sterilisiert werden sollen, von großer Bedeutung ist.

Fig. 140.



Einfacher Abfülltrichter.

Fig. 141.



Abfüllbürette.

Fig. 142



Abfüllapparat nach Treskow.

Nährböden, die nicht auf Reagensgläser abgefüllt werden, verteilt man zweckmäßig auf *Erlenmeyer*-Kölbchen zu 100—200 cm^3 , damit z. B. bei Agar im Falle des Bedarfs nur die jeweils erforderliche Menge verflüssigt zu werden braucht. Beim Abfüllen von Nährböden in Reagensgläser oder Kölbchen ist darauf zu achten, daß die Nährlösung nicht den Rand des Gefäßes berührt, weil sonst der Wattestopfen am Glase festklebt. Der Wattestopfen muß in die Öffnung fest eingedreht werden. Auf die Herstellung des Wattestopfens hat man gehörige Sorgfalt zu verwenden. Es genügt nicht, irgendwie ein Stückchen Watte in den Hals

des Röhrchens oder Kolben zu stopfen, sondern man muß dazu ein zusammenhängendes Stück Watte nehmen; die äußere Fläche des fertigen Wattestopfens muß eine möglichst kontinuierliche Schicht bilden.

VI. Menge der anzufertigenden Nährböden.

Die Menge der anzufertigenden Nährböden hat sich durchaus nach dem Bedarf zu richten. Man stelle also nur das her, was voraussichtlich in den nächsten Tagen oder Wochen auch verbraucht wird. Frisch hergestellte Nährböden geben den Bakterien die günstigsten Wachstumsbedingungen; alte Nährböden büßen mehr und mehr ihre Brauchbarkeit ein. Außerdem ist Sparsamkeit in der Nährbodenküche mit Rücksicht auf die außerordentlichen Preissteigerungen, welche die für die Bakterienzüchtung notwendigen Mittel erfahren haben, mehr denn je am Platze. Insbesondere werde der Anfänger stets und ständig zur Sparsamkeit ermahnt.

VII. Aufbewahrung der fertigen Nährböden.

Fertige Nährböden sind an einem vor Licht, Staub und starker Feuchtigkeit geschützten kühlen Orte aufzubewahren. Feuchtigkeit bietet Schimmelpilzen günstige Gelegenheit, sich auf Wattestopfen anzusiedeln und durch sie in das Innere der Nährbodengefäße zu gelangen. Wattestopfen auf Nährbodenkolben schützt man zweckmäßig in der Weise, daß man ihnen kleine Papierhelme aufsetzt.

VIII. Nährbodenbuch.

Sehr empfehlenswert ist die Führung eines Nährmittelbuches, wie es von *L. Heim* vorgeschlagen wird. In dieses Buch wird über jeden neu angefertigten Nährboden unter fortlaufender Nummer eine kurze Notiz eingetragen, die folgende Punkte berücksichtigt:

1. Laufende Nummer und Art des Nährbodens (Bouillon, Gelatine, Agar u. dgl.);

2. Datum;

3. Fleischwasser, aus welchem Fleisch oder Fleischextrakt; oder welches Fleischwasser (Nr. ?) zum Nährmittel genommen wurde.

4. Wieviel Wasser (Leitungs- oder destilliertes) oder wieviel fertiges Fleischwasser?

Zusätze, deren Menge, bei wieviel Grad gelöst?

Bei Agar, wie lange gequollen und wieviel Stunden gedämpft?

5. Neutralisiert mit wieviel Normal-NaOH oder KOH bis zum Lackmusblaupunkt?

6. Wieviel Normallauge nach 20 Minuten Dämpfen war noch bis zum Lackmusblaupunkt erforderlich? Also wieviel im ganzen?

7. Mit wieviel Normalsodalösung alkalisiert?

8. Kochprobe klar oder nicht?
9. Wenn Eiweißklärung nötig, welches und wieviel Eiweiß und bei welcher Temperatur zugegeben? Ausfall der Kochprobe darnach.
10. Von wieviel Uhr bis wieviel Uhr gedämpft?
11. Bemerkungen über Filtration oder Sonstiges (Zuckerzusatz u. s. w.). Jedes fertige Nährmedium bekommt die Nummer des Nährmittelbuches.

B. Generelle Nährböden.

Unter generellen Nährböden verstehen wir solche Nährböden, die zur Isolierung und zur Fortzüchtung der Mehrzahl der pathogenen Bakterien geeignet sind und infolgedessen im Laboratorium mehr oder weniger ständig vorrätig gehalten werden. Es hat sich nicht vermeiden lassen, daß in diesem Abschnitt einige Nährböden Aufnahme gefunden hätten, die mehr in den Abschnitt „Spezielle Nährböden“ hineingehört hätten. Zumeist handelt es sich jedoch um Nährböden, deren Herstellungsart für zahlreiche andere, mehr generelle Nährböden maßgebend geworden ist.

I. Nährböden aus Fleischwasser.

1. Fleischwasser.

Zur Herstellung von Fleischwasser, das die Grundlage unserer wichtigsten Nährböden bildet, wird gewöhnlich Fleisch vom Rinde oder Pferde benutzt, von anderen Tieren zumeist nur für Spezialzwecke. Pferdefleisch unterscheidet sich vom Rindfleisch dadurch, daß es mehr Glykosen bzw. Zucker enthält wie dieses. Im allgemeinen liefert Pferdefleisch Nährböden, die den Rindfleischnährböden annähernd gleichwertig sind. *Heiling* fand allerdings bei vergleichenden Untersuchungen, daß erstere in einzelnen Fällen, insbesondere für diagnostische Zwecke, weniger günstige Resultate lieferten als Rindfleischnährböden.

Fleisch von jungen, gut genährten Tieren gibt naturgemäß das beste Fleischwasser. Abgehangenes Fleisch ist frisch geschlachtetem vorzuziehen. Aber auch Fleisch von finnigen, trichinösen oder tuberkulösen Tieren läßt sich recht gut zu Nährböden verarbeiten. Da in der Jetztzeit das Pferdefleisch für den menschlichen Genuß sehr stark in Anspruch genommen wird und fast annähernd so hoch im Preise steht wie Rindfleisch, so wird man vielfach auf dieses Freibankfleisch angewiesen sein.

Herstellung des Fleischwassers:

1. Das zur Herstellung von Fleischwasser benutzte Fleisch muß möglichst frei von Fett und Sehnen sein.
2. Das Fleisch ist zu zerkleinern. Die Zerkleinerung wird zweckmäßig im Laboratorium selbst mittels einer Fleischhackmaschine vorgenommen.
3. Alsdann wird von dem zerkleinerten Fleisch eine bestimmte Menge abgewogen und mit der doppelten Menge destillierten oder Lei-

tungswassers übergossen. Das Gemisch wird gut umgerührt und über Nacht kühl stehen gelassen.

4. Hierauf wird das Fleischwasser durch ein grobes Leinwandtuch filtriert und der Rückstand mit der Hand oder mit einer Fleischpresse ausgepreßt.

5. Das blutig gefärbte, schwach sauer reagierende Fleischwasser wird zumeist unmittelbar zur Bereitung von Nährböden wie Bouillon, Gelatine, Agar verwendet, oder es wird für sich 1 Stunde im Dampftopf sterilisiert, filtriert, nochmals sterilisiert und bis zur weiteren Verwendung aufgehoben.

2. Nährbouillon.

Bei der Erhitzung des Fleischwassers wird ein großer Teil des Eiweißes ausgefällt; es wird daher bei der Herstellung der Nährbouillon zu dem Fleischwasser ein durch Kochen nicht gerinnbarer Eiweißkörper, meist in Form des Peptons hinzugefügt; außerdem ist ein Zusatz von Kochsalz erforderlich.

Peptone sind Umwandlungsprodukte der eiweißartigen Stoffe, die sich bei der Verdauung im Magen unter dem Einfluß des Pepsins, im Darm durch das Ferment der Bauchspeicheldrüse bilden. Die Eiweißkörper zerfallen bei der Spaltung in Albumosen und Peptone, die selbst noch Eiweißkörper sind. Die Peptone sind in Wasser völlig löslich, diffundieren sehr leicht durch Membranen und werden nicht gefällt durch Kochen oder Salpetersäure oder Essigsäure und Kaliumeisencyanür oder Essigsäure und Kochsalzsättigung. Gefällt werden sie aus neutraler oder schwach saurer Lösung durch Quecksilberchlorid oder Gerbsäure oder Gallensäure. Sie reagieren wie Eiweißkörper auf *Millons* Reagens mit roter Farbe und geben mit Salpetersäure Xanthoproteinsäurereaktion. Mit Ätznatron und etwas Kupfersulfat geben sie in der Kälte eine purpurrote Farbe (Biuretreaktion). Man unterscheidet Peptone der Pepsinverdauung und Peptone der Trypsinverdauung, außerdem nach der Herkunft Albuminpepton, Fleischpepton u. s. w.

Die für bakteriologische Zwecke gebräuchlichen Peptonarten sind durch kurzes Verdauen mit Pepsinsalzsäure aus Fibrin, Eiweiß u. a. dargestellt. Besonders bewährt hat sich das Peptonum siccum Witte; für die Züchtung mancher Bakterienarten (z. B. Meningokokken) ist die Verwendung des französischen Peptons Chapoteau vorzuziehen.

Das Pepton klumpt in Wasser oder Fleischwasser zusammen, löst sich aber in der Wärme allmählich auf. Zur Erleichterung der Lösung verreibt man das Pepton zunächst in einer Reibschale mit etwas Fleischwasser und setzt es alsdann zu der Nährlösung.

Zur Herstellung von 1 l Nährbouillon sind erforderlich:

- 1 l Fleischwasser,
- 10 g (= 1%) Pepton,
- 5 g (= 0.5%) Kochsalz.

Herstellung der Nährbouillon:

1. 1 l Fleischwasser wird in einem Aluminium- oder Emailtopf im Dampftopf oder über der offenen Flamme 1 Stunde gekocht. (Die Kochdauer hat sich nach der Menge des Nährmediums zu richten.) Beim Kochen auf offener Flamme ist das verdampfte Wasser zu ergänzen.

2. Filtrieren durch doppeltes Papierfilter.

3. Zusatz von 1 % Pepton und 0.5 % Kochsalz.

4. Neutralisieren mit Normalnatronlauge bis zum Lackmusneutralpunkt.

5. Erhitzen im Dampftopf für 30 Minuten.

6. Die Reaktion der Bouillon ist nachzuprüfen. Häufig ist sie wieder schwach sauer geworden, so daß blaues Lackmuspapier etwas gerötet wird. Wiederherstellung des Lackmusneutralpunktes und Zusatz von so viel Normalsodalösung (s. S. 538), daß die Flüssigkeit leicht alkalisch reagiert.

7. Falls die Nährbouillon nicht klar ist, wird in der auf S. 546 angegebenen Weise mit Serumeiweiß geklärt und nochmals filtriert.

8. Abfüllen der fertigen Bouillon in Reagensgläser zu je 5 oder 10 cm^3 oder in Patentflaschen oder Kölbchen zu 100 bzw. 200 cm^3 , je nach dem Bedarf.

9. Sterilisieren der gefüllten Röhrchen u. s. w. während einer Stunde im Dampftopf.

Nach *Hottinger* beruhen die Grundlagen der üblichen Fleischwasserbereitung auf unrichtigen Voraussetzungen. Auf Grund vergleichender Versuche stellte er fest, daß weder Aufenthalt bei niedriger Temperatur noch Maceration bei 50° noch längeres Kochen notwendig ist. Die Extraktion des Fleisches ist in wenigen Minuten maximal, wobei die Temperatur eine durchaus untergeordnete Rolle spielt, insofern das Fleisch aufgeköcht wird. Ob dasselbe in siedendes Wasser geworfen und sofort verarbeitet, oder stunden- und tagelangen Macerationen unterworfen wurde, ergab für die Nährbodenbereitung praktisch keine Differenz. Im Rückstande der üblichen Bereitung bleibt ein großer Teil Extraktiv- und Nährstoffe absorbiert oder unlöslich und wird weggeworfen. Um eine völlige Ausnutzung der Nährstoffe zu erreichen, unterwarf *Hottinger* das Fleisch der Pankreatinverdauung und gewann auf diese Weise eine Flüssigkeit, welche die hochwertigsten Peptone, Polypeptide und Aminosäuren enthielt.

Herstellung der Verdauungsbrühe nach *Hottinger*:
Etwa 1.5 l Wasser werden aufs Feuer gesetzt und zum Sieden gebracht. Inzwischen wird Fleisch in stark fingerdicke Streifen und Stücke geschnitten und davon 1 kg abgewogen und in das nunmehr siedende Wasser geworfen. Kommt das Wasser wieder in starkes Sieden, so wird der Topf vom Feuer genommen. Das Fleisch wird mit einer Gabel herausgefischt und durch die Maschine getrieben.

Das auf Handwärme abgekühlte Fleischwasser kommt in eine Weithalsflasche von etwa 2 l Inhalt; es werden demselben zugefügt: eine Messerspitze Natriumcarbonat (Soda entwässert) (etwa 1.5 g), ein gehäufte Teelöffel Pancreatinum siccum (etwa 3 g), 15–20 cm³ Chloroform; nunmehr wird der Pfropfen aufgesetzt und gründlich durchgeschüttelt.

Das gekochte Hackfleisch wird in die Flasche gegeben und wieder tüchtig geschüttelt, wobei die Flasche am Boden und über dem Pfropfen zu fassen ist, um das Ausschleudern des letzteren zu verhüten; nun wird das Gemisch an einen warmen Ort gestellt. Gelegentlich soll die Flasche geschüttelt werden. Die Verdauung dauert bei Zimmertemperatur etwa 5 Tage und mehr, bei 37° etwa 2 Tage. Über 40° darf nicht erwärmt werden.

Die Verdauung wird durch leichtes Ansäuern mit Salzsäure unterbrochen, der Brei auf ein nicht zu kleines Filter (ca. 40 cm Durchmesser) gegossen. Ist der Brei filtriert, so wird der Rückstand samt Filter in etwa 2 l Wasser gegeben, tüchtig durchgerührt und wieder filtriert. Die vereinigten Filtrate werden im offenen Topf einige Minuten gekocht, je nach Anordnung und Bedarf auf 10–30–50 l verdünnt und wie üblich behandelt.

Oder nach dem Ansäuern wird das Verdauungsgemisch gemessen und wieder in die Flasche zurückgebracht, die Menge notiert und aufbewahrt. Säure und Chloroform verhindern die Fäulnis. Bei Bedarf wird die Hälfte, ein Drittel u. s. w. des vorher geschüttelten Breies filtriert, verdünnt und gekocht, wie oben.

Für gewöhnliche Zwecke können vorteilhaft 100–200 cm³ des Breies entnommen, in 1 l Wasser gegossen, filtriert und aufgekocht werden. Nach leichtem Alkalisieren ist der Nährboden fertig.

Hottinger empfiehlt, seiner Verdünnungsbrühe noch Salze hinzuzusetzen, u. zw. in folgender Weise: Es wird eine konzentrierte Kochsalzlösung hergestellt, u. zw. aus nicht gereinigtem Krystallsalz (Viehsalz), das namentlich reich an Magnesium und Calciumsalzen ist. Die Lösung wird filtriert und zu 100 cm³ 5 g zweibasisches Kaliumphosphat (K₂HPO₄) zugefügt, das sich langsam löst. Enthält das Wasser keinen Kalk oder nur Spuren, so wird zur Kochsalzlösung eine kleine Messerspitze dreibasisches Kalkphosphat zugefügt, das sich nur teilweise löst und die Lösung trübt. Für den Gebrauch werden auf 1 l Wasser 20 cm³ der so hergestellten Lösung gegeben und (falls Calciumphosphat zugefügt wurde) filtriert. Diese Lösung enthält dann im Liter annähernd 7 g Kochsalz (Magnesium- und Calciumsalze als Verunreinigung) und 1 g Dikaliumphosphat.

Die von *Hottinger* angegebene Verdauungsbrühe bedeutet eine ganz erhebliche Verbilligung der Nährbodenbereitung, da einmal aus der gleichen Menge Fleisch eine viel größere Menge Nährbouillon gewonnen wird als bei der sonst üblichen Methode, und da zweitens der Zusatz von

Pepton, dessen Preis geradezu ungeheuerlich gestiegen ist (1 kg kostet 700 Mark), sich erübrigt.

Baerthlein, der die Brauchbarkeit der Verdauungsbrühe und der aus ihr hergestellten Nährböden einer vergleichenden Nachprüfung unterzogen hat, kommt zu recht befriedigenden Ergebnissen. Auch nach meinen Erfahrungen liefert die Verdauungsbrühe ein Nährsubstrat, das für viele Zwecke recht brauchbar ist. *Baerthlein* stellte sich aus der *Hottinger*-Stammlösung zwei verschiedene Arten von Nährbouillon her.

Lösung a: Zu der verdünnten Stammlösung (eine dem Bedarf entsprechende Menge der vorher geschüttelten, breiigen Lösung wird im Verhältnis von 1 : 10 mit Leitungswasser verdünnt, filtriert und kurz aufgekocht) werden pro Liter 5 g Kochsalz und 0.2 g Kal. biphosphoric. zugesetzt, die Mischung wird auf Reagensröhrchen abgefüllt und kurz sterilisiert. Das Wachstum aller Bakterienarten wie Cholera, Typhus, Paratyphus, Ruhrbacillen war gut. Diese Nährlösung eignet sich nach *Baerthlein* ganz besonders zum Nachweis der Indolbildung und stellt einen guten Ersatz der *Zipfelschen* Tryptophanlösung dar. Sie ist nicht nur billiger, sondern soll auch viel zuverlässiger als die Tryptophanlösung sein und eine streng spezifische Indolreaktion liefern.

Lösung b: Zu der verdünnten Stammlösung nach *Hottinger* fügt man außer den Salzen wie bei Lösung a noch 1 % Pepton Witte hinzu. Das Wachstum der verschiedenen Bakterienarten ist dann noch besser und unterscheidet sich dann nicht mehr von dem in guter gewöhnlicher Bouillon; die Indolbildung dagegen fällt etwas schwächer aus wie bei der Lösung a.

3. Nährgelatine.

Sie wird in der Weise hergestellt, daß zu Fleischwasser außer den bei der Bereitung der Nährbouillon notwendigen Zutaten noch Gelatine hinzugefügt wird.

Gelatine und Leim sind amorphe, stickstoffhaltige Produkte aus tierischen Abfällen, welche in kaltem Wasser unlöslich sind, jedoch in ihm aufquellen und beim Erwärmen sich lösen. Beim Wiedererkalten findet keine Trennung vom Lösungsmittel statt, sondern es bildet sich eine elastische, durchsichtige, farblose Masse, eine Gallerte, deren Festigkeit im allgemeinen umso größer ist, je geringer die Menge des aufgenommenen Wassers ist. Das Erstarren einer solchen Lösung zu einer amorphen elastischen Masse beim Abkühlen nennt man Gelatinieren, ihren wirksamen Bestandteil Gelatine.

Gelatine wird aus Leder, Hautabfällen und Knochen gewonnen. Dünnschnittgelatine besteht aus papierdünnen, vollständig durchsichtigen, farblosen, elastischen Blättern mit grobgezackten Rändern; gewöhnlich sind die Netzeindrücke vom Trocknen auf den Blättern sichtbar.

Die zur Herstellung von Nährböden verwendete Speisegelatine besitzt eine starke, je nach der Bereitung des Produkts schwankende saure

Reaktion. Sie enthält durchgängig schweflige Säure (*A. Müller*), die aber, solange sie nur in geringen Mengen vorhanden ist, ohne Einfluß auf die Nährbodenbereitung ist.

Herstellung der Nährgelatine:

1. Zu 1 l Fleischwasser gibt man 10 g (= 1 %) Pepton, 5 g (= 0.5 %) Kochsalz, 100 g (= 10 %) Gelatine.

2. Dieses Gemisch läßt man stehen, bis die Gelatine aufgequollen ist. Alsdann wird die Gelatine durch mäßiges Erwärmen (Einstellen des Gefäßes in Wasser von 40—50° Wärme) gelöst. Die Erwärmung soll keinesfalls hierbei so weit gehen, daß das Muskeleiweiß ausgefällt zu werden beginnt.

3. Sterilisieren und ganz schwach alkalisieren.

4. Zusatz von Serumeiweiß zwecks Klärung des Nährbodens.

5. Erhitzen im Dampftopf während einer Stunde.

6. Prüfung der Reaktion. Falls ein Nachsäuern stattgefunden hat, ist die Reaktion richtigzustellen.

7. Filtration durch ein gutes Faltenfilter. Das Filtrat muß klar durchsichtig erscheinen und darf sich beim Aufkochen nicht trüben: es muß schwach alkalisch auf Lackmus reagieren.

8. Abfüllen des Nährbodens auf Röhrchen oder Kölbchen.

9. Diskontinuierliche Sterilisation im Dampftopf an 3 Tagen je 30 Minuten lang.

Für die Brauchbarkeit der Nährgelatine ist eine passende chemische Reaktion des Nährbodens von großer Bedeutung. Es empfiehlt sich nicht, die Reaktion gleich am Anfange (bei Nr. 3 des Nährbodenrezepts) vor dem Ausfällen der Eiweißkörper zu stark alkalisch zu stellen, weil hierdurch der nachfolgende Klärungsprozeß sehr schlecht und unvollkommen vor sich gehen würde. Je weniger alkalisch das Nährbodengemisch gehalten wird, desto schneller und besser klärt es sich beim Kochen. Auch mit Rücksicht auf das beim Kochen eintretende Nachsäuern ist es angezeigt, die endgültige Regulierung der Reaktion erst nach dem Kochen vorzunehmen.

Eine brauchbare Nährgelatine soll erst bei Temperaturen über 24° weich und bei 28° und darüber flüssig werden. Der Schmelzpunkt der fertigen Nährgelatine ist naturgemäß zunächst abhängig von der Erstarrungsfähigkeit der verwendeten Gelatine, die bei den verschiedenen, im Handel erhältlichen Sorten keineswegs stets die gleiche ist. Man unterscheidet infolgedessen auch weiche und harte Gelatinesorten. Von der Firma Gehe & Co. in Dresden wird eine Gelatine unter der Bezeichnung „Non plus ultra“ in den Handel gebracht, die bei vorsichtiger Behandlung einen Nährboden liefert, der erst bei 31—32° schmilzt.

Für gewöhnliche Zwecke genügt ein Zusatz von 10 % Gelatine, um einen genügend festen Nährboden zu erhalten. Kommt es darauf an, einen möglichst widerstandsfähigen Nährboden zu erhalten, so kann der Gelatinezusatz erhöht werden.

Von erheblichem Einfluß auf die Erstarrungsfähigkeit der Gelatine sind die Art und die Dauer der Erhitzung bei der Herstellung des Nährbodens. Je vorsichtiger und je kürzer die Erhitzung vorgenommen wird, umso höher bleibt der Schmelzpunkt der Gelatine. Langes und wiederholtes Erhitzen bedingt eine Erniedrigung des Schmelzpunktes. So fand *van der Heide*, daß der Schmelzpunkt der Gelatine pro Stunde Erwärmung auf 100° um 2° herabgesetzt wird. Erhitzungen der Gelatine auf Temperaturen von über 100° sind zu vermeiden, da sie nach *Gaetgens* auch bei kurzer Einwirkungsdauer eine starke Peptonisierung der Gelatine und eine schnelle Erniedrigung ihres Schmelzpunktes zur Folge haben.

Um die durch die Erhitzung bedingte Schädigung der Erstarrungsfähigkeit der Gelatine nach Möglichkeit einzuschränken, ist es vorteilhaft, den Nährboden nach dem Erhitzen schnell auf Eis abzukühlen. Aus dem gleichen Grunde ist zu fordern, daß die Nährgelatine sofort nach dem Filtrieren in gebrauchsfertigen Mengen auf Röhrchen oder Kölbchen abgefüllt wird, und daß in diesen die endgültige, gleichfalls möglichst kurze Sterilisation vorgenommen wird. Auf alle Fälle ist wiederholtes Erhitzen der Gelatine auf 100° tunlichst zu vermeiden.

Gelatinenährböden mit besonders hohem Schmelzpunkt, etwa 30°, sind verschiedentlich angegeben worden, so von *Pane* und *Elsner*. *Forster* stellte Nährgelatine mit besonders hohem Schmelzpunkt in folgender Weise dar: In 1 l 60grädiger warmer, steriler Nährbouillon löst man (im kleinen Kessel) 100—150 g Gelatine, fügt Kalilauge bis zu schwach saurer Reaktion zu und alkalisiert leicht mit Natriumbicarbonat. Darnach wird das Weiße eines Eies hinzugefügt. Nunmehr wird der kleine Kessel in einen großen Kochtopf mit kochendem Wasser gestellt, die Gelatine gut umgerührt, die in einigen Minuten auf 98—99° erhitzt ist. Hierauf kocht man den großen Kochtopf samt Gelatinekessel mit aufgelegtem Deckel etwa 15 Minuten, filtriert in 60gradigem warmen Heißwassertrichter und sammelt die ganze Gelatine in einem Kolben. Abfüllen der Röhrchen und Sterilisation derselben im Dampftopf 20 Minuten lang. Schnelles Abkühlen der Röhrchen durch Einsetzen in kaltes Wasser. Die Gelatine ist dann gebrauchsfertig und steril; ihr Schmelzpunkt liegt nach mehrtägiger Aufbewahrung bei 29—30°, vorher ist er etwas niedriger.

Die Herstellungsmethode nach *Forster* berücksichtigt demnach alle die zuvor aufgeführten Punkte, die zur Erhaltung einer guten Erstarrungsfähigkeit der Gelatine beitragen können, im weitgehenderen Maße.

Setzt man zu gewöhnlicher Nährgelatine statt 0.5 % Kochsalz 3 % hinzu, so erhält man einen Nährboden, der sich besonders zur Züchtung von Leuchtbakterien eignet. Zuweilen, glücklicherweise selten, kommen Gelatinetafeln vor, die besonders widerstandsfähige Keime enthalten (*L. Heim*). Derartiges Ausgangsmaterial ist für die Herstellung von Nährgelatine ungeeignet.

4. Nähragar.

Für die Züchtung von Bakterien bei Körpertemperatur, die für die Mehrzahl der Bakterien das Wachstumsoptimum darstellt, ist die Nährgelatine wegen ihres niedrigen Schmelzpunktes ungeeignet. In dem von Frau *Angelina Hesse* in die Nährbodentechnik eingeführten Agar besitzen wir ein Präparat, das dem Nährboden zugesetzt eine bei 37° durchaus unverändert bleibende Gallerte bildet. Die Einführung der Agarnährböden hat die Gelatinenährböden fast völlig verdrängt, so daß diese fast nur noch für Spezialzwecke Verwendung finden.

Agar-Agar, wie es eigentlich heißt, wird aus asiatischen Algen, u. zw. vornehmlich von *Gelidium corneum* Lamour und einigen anderen Arten gewonnen. Agar-Agar dient in seiner asiatischen Heimat als Nahrungsmittel, kam 1840 als Heilmittel nach Europa und wird jetzt in der Appretur, in der Küche und Konditoreien als Ersatz für Knochengelatine sowie als Verfälschungsmittel für Fruchtgelees angewendet.

Hauptbestandteil des Agars ist die pektinartige Gelose, die aus verschiedenen Kohlehydraten besteht, aber keinen Leim enthält, so daß eine Verflüssigung des Agars durch peptonisierende Bakterien nicht stattfinden kann. Die gallertbildende Kraft des Agars ist 6—10mal größer als die der Gelatine. Agar quillt in kaltem Wasser, löst sich aber erst beim Sieden; er erstarrt beim Erkalten schnell bei ungefähr 40° und bildet alsdann eine Gallerte, die haltbarer als tierische ist.

Im Handel ist Agar in Gestalt von vierkantigen Stangen oder von Fäden oder in Pulverform erhältlich. Die besten Gallerten liefert im allgemeinen der Stangenagar, die schlechtesten der pulverförmige Agar; dementsprechend pflegen auch die Preise der verschiedenen Agarsorten zu sein.

Die Zusammensetzung des Nähragars entspricht durchaus der der Gelatine, nur daß an Stelle der letzteren Agar tritt. Der gewöhnliche Nähragar erhält in der Regel einen Zusatz von 1·5% Agar, wenn es sich um ein gut gelatinierendes Präparat handelt; im anderen Falle ist ein Zusatz von 2% notwendig. Stärkere Agarzusätze erfordern bestimmte Spezialnährböden, deren Besprechung später erfolgt.

Da Agar sich nur langsam und schwer auflöst, so ist es geboten, ihn zu zerkleinern und vor dem Erhitzen in der Nährflüssigkeit mindestens mehrere Stunden, am besten über Nacht quellen zu lassen. Seine Lösung geht alsdann beim Erhitzen verhältnismäßig schnell vor sich.

Begünstigt wird die Lösung des Agars durch saure Flüssigkeiten. Jedoch erfährt die Erstarrungsfähigkeit des Agars Einbuße, die durch nachfolgende Alkalisierung nicht ausgeglichen werden kann.

Rosam sucht die Lösung des Agars durch Vorbehandlung mit Essigsäure zu beschleunigen. Er legt den Agar nach der Zerkleinerung auf etwa 5 Minuten in 10%ige Essigsäure und wäscht hinterher die Essigsäure mit fließendem Wasser aus, der so präparierte Agar kann getrocknet und längere Zeit aufbewahrt werden. Durch diese Behandlung

wird erreicht, daß der Agar leichter filtriert, einen niedrigeren Schmelzpunkt bekommt und erst bei 35° fest wird, d. h., daß seine Erstarrungsfähigkeit stark beeinträchtigt wird.

Zu lang ausgedehntes oder zu oft wiederholtes Kochen verträgt auch Agar nicht, seine Erstarrungsfähigkeit leidet darunter.

Die Filtration des Agars geht schwer vor sich; sie erfordert besondere Maßnahmen. Am besten bewährt hat sich Filtration durch Watte, wie sie S. 544 beschrieben worden ist.

Um eine Filtration des Agars zu vermeiden, sucht *Oswald Richter* den Agar in folgender Weise durch Wässerung zu klären:

18 g Agar-Agar werden abgewogen, mit der Schere in 2—3 cm lange Stückchen zerschnitten und in ein Einsiedeglas gegeben, das mit Organtin überzogen und mit einem bis auf den Grund des Gläschens reichenden, durch einen Schlauch mit der Wasserleitung verbundenen Glasröhrchen versehen wird. Derart wässert man den Agar 1—2 Tage im fließenden Leitungswasser, gießt dann das Leitungswasser ab und ersetzt es nach Entfernung des Organtins und des Glasröhrchens durch destilliertes Wasser, das etwa viermal innerhalb von zwei weiteren Tagen gewechselt wird. Schließlich löst man den Agar in etwa 700 cm³ frischem destillierten Wasser, filtriert im Sterilisator das völlig klare Filtrat ab und ergänzt nun auf 1000 cm³. Dabei hat man darauf zu achten, daß die verwendeten Glasgefäße und Glastrichter aus schwer löslichem, womöglich Jenenser Glase bestehen, weil der Agar von gelösten Alkalien immer eine starke Bräunung erfährt. Hat man den Agar richtig hergestellt, so ist er im gelösten Zustande eine fast wasserklare Flüssigkeit, beim Erkalten aber eine weiß opaleszierende Gallerte. Vor dem Gebrauch ist der Agar mit den notwendigen Nährsalzen zu versehen.

Herstellung des Nähragars:

1. Zu 1 l Fleischwasser setzt man 10 g Pepton und 5 g Kochsalz hinzu.
2. Erhitzen der Mischung, ohne sie zu neutralisieren, für eine Stunde im Dampftopf.
3. Filtrieren durch ein Papierfilter.
4. Zu der Flüssigkeit gibt man alsdann 15—20 g zerkleinerten Agar.
5. Quellenlassen des Agars in der Nährlösung während mehrerer Stunden oder über Nacht.
6. Erhitzen im Dampftopf während einer Stunde.
7. Sterilisieren und leicht alkalisieren.
8. Zusatz von Serumeiweiß zwecks Klärung des Nährbodens, aufkochen und durch Watte filtrieren.
9. Kontrolle der Reaktion und Klarheit.
10. Abfüllen in Kölbchen oder Reagensgläser.
11. Sterilisieren derselben im Dampftopf während einer Stunde.

Die Klärung des Agars läßt sich auch durch Sedimentieren erzielen. Zu diesem Zwecke gießt man den flüssigen, heißen Agar auf einen mit Papierfilter versehenen großen Trichter, den man für mehrere Stunden

in den warmen, aber nicht mehr geheizten Dampftopf stellt. Geringe Mengen des Agars werden durch das Filter gehen, der Rest erstarrt allmählich, nachdem sich die Trübungen in der Trichterspitze angesammelt haben. Alsdann löst man die Agarmasse aus dem Trichter, entfernt mit dem Wasser die trüben Massen von den klaren. Erstere können nunmehr für sich im Dampftopf filtriert werden.

Auf dem zuvor beschriebenen Nähragar wächst die Mehrzahl der bekannten Bakterien: es ist derjenige Nährboden, mit dem wir gewohnt sind, täglich zu arbeiten.

5. Ersatzpräparate für Fleisch und Pepton.

Um die Herstellungskosten der Fleischwassernährböden möglichst niedrig zu halten, hat man schon frühzeitig nach geeigneten Ersatzpräparaten für das Fleisch Umschau gehalten. Man fand ein solches in dem *Liebigs*chen Fleischextrakt, der für zahlreiche Fälle einen durchaus brauchbaren und verhältnismäßig preiswerten Ersatz darstellt. Während des Krieges verursachte die außerordentlich vermehrte Untersuchungstätigkeit und insbesondere die Herstellung von Tausenden von Litern Impfstoff einen Nährbodenverbrauch, wie man ihn zuvor kaum für möglich gehalten hätte. Dazu kam die immer schwieriger werdende Beschaffung von Fleisch und das allmähliche Ausgehen von *Liebigs* Fleischextrakt. Die Folge davon war, daß lebhaft nach einem brauchbaren Ersatz für Fleisch gesucht wurde und zahlreiche Vorschläge in dieser Richtung gemacht wurden. Auch das Pepton wurde während des Krieges schwerer und schwerer erhältlich und hat nach dem Kriege eine Preissteigerung erfahren, durch die die Nährböden in ungeahnter Weise verteuert wurden. Auch für Pepton ist Ersatz angegeben worden. Nachstehend sei eine Anzahl von Ersatzpräparaten wiedergegeben.

a) Ersatz des Fleisches durch Fleischextrakt. Statt des Fleischwassers kann man auch eine 1—2%ige Lösung von *Liebigs* Fleischextrakt verwenden. Die hiermit hergestellten Nährböden sehen etwas dunkler als Fleischwassernährböden aus und sind letzteren bezüglich des Bakterienwachstums nicht völlig gleichwertig. Dies dürfte im wesentlichen darauf zurückzuführen sein, daß der Fleischextrakt bei seiner Herstellung hohen Temperaturen für lange Zeit ausgesetzt werden muß, die erhebliche Veränderungen seiner Grundstoffe bedingen. Trotz dieser Vorbehandlung begegnet man gelegentlich Extrakten, die sehr widerstandsfähige Sporen enthalten. Ferner enthalten auch vereinzelte Extrakte etwas peptonisierendes Ferment, das die Erstarrungsfähigkeit der mit dem Extrakt bereiteten Nährgelatine beeinträchtigen kann.

b) Ersatz des Fleisches durch Blut: a) nach *Szász*.

Der Blutkuchen wird mit der Hand oder mit einem Stück Holz in Brocken von Walnuß- oder Haselnußgröße zerkleinert. Die Masse wird gewogen — falls der Kuchen nicht bei Serumerzeugung gewonnen.

sondern vom Schlachthof bezogen wurde, wird auch das Serum mitgewogen —; es sind für jedes Kilogramm Blut 1.5 l Wasser zuzugießen. Nachdem das Ganze gut durchgerührt wurde, läßt man es in kühlem Raum 20—24 Stunden stehen, während welcher Zeit es einigemal gut umzurühren ist.

Hiernach wird die Masse durch die übliche grobe Leinwand filtriert und das Filtrat so lange gekocht, bis sich der Blutgehalt darin zu braunen Klümpchen zusammensetzt und der Saft zugleich durchsichtig gelb wird. Letzteres kann man beim Zurückkinnen der mit dem Kochlöffel oder mit dem Umrührglasrohr emporgehobenen Flüssigkeit gut beobachten bzw. feststellen. Die beim Kochen eingehende Flüssigkeit wird auf das ursprüngliche Quantum aufgefüllt, die chemische Reaktion dem Zwecke entsprechend korrigiert. Zusatz von Pepton und Kochsalz erfolgt wie bei der Fleischwasserbouillon. Die aus Blut gekochte Bouillon ist immer stark alkalisch, es kann daher die Neutralisierung bzw. Säuerung kaum fortbleiben; anderseits kann aber auch die Zugabe von Kochsalz reduziert werden bzw. das Kochsalz ganz wegbleiben.

Das Wachstum der Bakterien erfolgt nach *Szász* auf Blutbouillon sowie auf mit dieser hergestellten festen Nährböden in derselben Weise wie auf mit Fleischwasser bereiteten Nährböden.

β) Nach *Lichtenstein*, deren Verfahren nur wenig von dem zuvor beschriebenen abweicht.

Das von dem Viehhofe bezogene Blut wird abgewogen. Der Blutkuchen wird in einer Fleischhackmaschine zu einem Brei zermahlen. Das Ganze wird mit der doppelten Menge destillierten Wassers versetzt und in einem Emailtopf über einer offenen Flamme unter ständigem Umrühren gekocht. Nachdem das Ganze 10 Minuten lang gekocht hat, setzt man konzentrierte Essigsäure zwecks besserer Koagulierung hinzu, läßt weitere 5 Minuten kochen, nimmt den Topf vom Feuer weg und stellt ihn schräg, damit die Gerinnselteilchen sich einigermaßen absetzen. Die Flüssigkeit muß dann kalt koliert werden; sie wird hierauf in einem Glaskolben mit den nötigen Mengen Pepton, Kochsalz und Agar versetzt.

Lichtenstein hat versucht, den Nährboden ohne Peptonzusatz herzustellen: der Erfolg war angeblich günstig. Streptokokken und Diphtheriebacillen wuchsen auf dem peptonlosen Blutagar etwas spärlicher als auf dem peptonhaltigen Nährboden.

γ) Nach *Langer*. Der zerkleinerte Blutkuchen wird mit der $1\frac{1}{2}$ -fachen Menge einer Verdauungslösung versetzt, die 2 g Pankreon Rhenania, 1 g Natriumcarbonat und 5 cm³ Chloroform im Liter enthält. Nach 48stündiger Verdauung bei 37° wird das Gemisch aufgeköcht und filtriert. Es ergibt sich eine klare, dunkelbraune Flüssigkeit, die nach Einstellung der gewünschten Reaktion ohneweiters als Nährbouillon verwendbar ist; ein Zusatz von Pepton ist nicht erforderlich. Nach *Langer* ist das Wachstum aller Bakterien auf dieser Blutbouillon ein ausgezeichnetes.

c) Ersatz des Fleisches und Peptons durch Blutplasma nach *Löffl.* Das Rohmaterial, das Plasma, wurde nach *Arthus* und *Pages* (A. de Physiol. 1890 V, S. 739) gewonnen. In 1 l 0·8% iger Ammoniumoxalatlösung läßt man unter Rühren 9 l Blut laufen, mischt es gut und zentrifugiert in einer Zentrifuge mit 3000 Umdrehungen in der Minute. Das aus der Zentrifuge ablaufende Plasma beträgt 6·280 l, welches ca. 10% feste Substanz beim Verdampfen hinterläßt. Das Plasma wird nun, nachdem das zuerst zugesetzte Oxalat mit Calciumacetat gefällt worden ist, mit 40 g Trypsin versetzt, 8 Tage nach *Abderhalden* hydrolysiert bzw. peptonisiert; die Trypsinwirkung wird nach dieser Zeit durch Kochen unterbrochen; alsdann absetzen lassen, filtrieren und sterilisieren. Diese nunmehrige Nährlösung enthält durchschnittlich 8% Nährsubstanz, sie wird zum Gebrauch auf 1:3 verdünnt.

Löffl empfiehlt den Plasmanährstoff zur Herstellung von Nährböden für Massenkulturen.

d) Ersatz des Fleischwassers durch Harn nach *J. Heller*. Am besten eignet sich der phosphatarme, in nüchternem Zustande gelassene Harn. Der nach Desinfektion des Orificium urethrae entleerte Harn ist, abgesehen von der ersten Portion, die man nicht auffängt, steril. Zur Bereitung fester Harnnährböden wird der Harn wie Fleischwasser verwendet.

e) Ersatz von *Liebig's* Fleischextrakt durch *Maggi's* Erzeugnisse. *Hart* verwendet sowohl die gekörnte Fleischbrühe wie auch die Bouillon nach *Maggi*. 10 g gekörnte Fleischbrühe und 10 g Pepton geben mit 1 l Wasser eine brauchbare Nährbouillon. Der Zusatz von Salz hat zu unterbleiben. *Piorkowski* schreibt für je 1 l vor: 3 Maggiwürfel = 12 g, 10 g Pepton, dazu Natriumcarbonat 0·025 g für Agar oder 0·05 g für Gelatine.

f) Ersatz des Fleisches durch Ochsenä. Ochsenä stellt einen Pflanzenfleischauszug von dicksirupartiger Beschaffenheit, dunkelbrauner Farbe und angenehmem Geruch dar. Nach *Hirschbruch* und *Diehl* ist Ochsenä ein vollkommener, gleichwertiger Ersatz für *Liebig's* Fleischextrakt während *Maggi's* gekörnte Fleischbrühe weniger geeignet sei. Von *Guth* wird jedoch auch Ochsenä als nicht vollwertiger Ersatz für *Liebig's* Fleischextrakt bezeichnet.

g) Ersatz des Fleisches und Peptons durch Bier nach *Sobel*. 500 cm³ Bier — abgestandenes ist vorzuziehen, sowie womöglich auch Pilsener — werden 5 Minuten lang zur Entfernung des Alkohols kochend gehalten und hierauf nach dem Abkühlen mit etwa 550 cm³ Brunnenwasser auf 1 l gebracht. Als dann Verarbeitung zu Agar ohne Peptonzusatz.

h) Ersatz von *Liebig's* Fleischextrakt und anderer Fleischextrakte durch Extrakt aus Magermilch. *Pfeiler* empfiehlt einen von dem Deutschen Nährmittelwerk Dr. Eickloff. G. m. b. H., in Greifswald hergestellten Extrakt aus Magermilch als recht

brauchbaren Ersatz des Fleisches oder Fleischextraktes bei der Herstellung von Nährböden.

i) Ersatz von Fleischextrakt durch Extrakt von Bohnen und Sojabohnen nach *Guth*. 100 g Bohnen läßt man mit etwa 600 cm³ Wasser zunächst 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Die Mischung wird darauf eine Stunde im Dampftopf erhitzt, die überstehende Flüssigkeit abgeseiht und der Rückstand noch ein zweites Mal mit etwa 500 cm³ Wasser eine Stunde erhitzt, abgeseiht und leicht ausgepreßt. Die vereinigten Auszüge werden auf 1 l aufgefüllt und zur Herstellung von Nähragar mit 1 % Pepton, 0·5 % Kochsalz und Agar versetzt. Sojabohnen werden in der gleichen Weise verarbeitet, nur daß man sie ohne vorherige Extraktion mit kaltem Wasser direkt im Dampftopf erhitzt. Die weitere Bereitung der Spezialnährböden geschieht in derselben Weise, wie es oben angegeben wurde. Durch Eindampfen des wässerigen Bohnenauszeuges, etwa bis zur Konsistenz des *Liebigschen* Fleischextraktes, erhält man aus 1 kg Bohnen etwa 200 g eines dunkelbraunen, angenehm aromatisch riechenden Extraktes. Sojabohnen liefern durchschnittlich etwa 10 % mehr Extrakt, der fast geruchlos ist.

Auch auf den mit Bohnenextrakt hergestellten Spezialnährböden war das Wachstum der von *Guth* geprüften Bakterienarten ein gutes.

k) Ersatz des Fleisches durch Tierkörpermehl, mit dem zuerst *Burchardt* Nährböden hergestellt und gutes Bakterienwachstum erzielt hat. *Galli-Valerio* verarbeitet das Tierkörpermehl zunächst zu einer Stammlösung, indem er 400 g Tierkörpermehl mit 1200 g destilliertem Wasser nach guter Mischung 45 Minuten auf 100° erhitzt und nach dem Absetzen filtriert. Das Filtrat wird mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt. 100 g der Stammlösung geben mit 100 g Aqua dest., 1 g Pepton und 0·5 g Kochsalz eine Nährbouillon, nachdem das Gemisch gekocht, neutralisiert und filtriert ist.

l) Ersatz des Fleischwassers und Peptons durch Kartoffelwasser nach *W. Gaehtgens*:

1. 500 g Kartoffeln, die sorgfältig gewaschen und geschält worden sind, in 1 l Wasser auf einem Porzellanreißer möglichst unter Wasser fein zerreiben;
2. 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen lassen;
3. vom Bodensatz vorsichtig durch ein reines Tuch abgießen;
4. 1 Stunde auf 100° erhitzen;
5. filtrieren (eventuell zweimal) durch Filtrierpapier.

Das auf diese Weise erhaltene Kartoffelwasser kann nun entweder gleich durch Zusatz von Agar, Kochsalz und Soda zu einem festen Nährboden verarbeitet oder nach einstündiger Sterilisierung im Autoklaven aufbewahrt werden. Der Verzicht auf das Pepton bedeutet eine weitere Verbilligung des Nährsubstrates, durch welche die Güte desselben nicht beeinträchtigt wird.

Gaeltgens empfiehlt die Verwendung des Kartoffelwasseragars besonders für die Herstellung von Typhusimpfstoffen.

m) Ersatz des Fleisches und Peptons durch Hefewasser: a) nach *Wagner*:

Wagner empfiehlt Nährhefe vom Institut für Gärungsgewerbe, Berlin N 65. Sie wird aus durch Sieben und Waschen gereinigter, vollständig entbitterter und bei etwa 125° getrockneter Hefe dargestellt; sie ist ein gelbweißes, würzig riechendes, feinkörniges Pulver, dessen Zusammensetzung folgendermaßen angegeben wird: Wasser 8%, Eiweiß 54%, anorganische Salze 7% (darunter reichlich Phosphate), Fett 3·5%, Rohfaser 5%, stickstofffreie Extraktivstoffe 26%, darunter bis zu 20% Glykogen.

Herstellung des Hefeagars nach *Wagner*: 30 g Nährhefe, 5 g Kochsalz, 15 g Agar werden mit 1000 cm³ Leitungswasser im Autoklaven bei 1/2 Atmosphäre Überdruck bis zur völligen Lösung des Agars gekocht. Steht ein Autoklave nicht zur Verfügung, so empfiehlt es sich, die Nährhefe mit dem Kochsalz in einem, den Agar unter Zusatz von ein wenig Normal-HCl in einem anderen Gefäß im Dampftopf zu kochen und erst nach Lösung des letzteren die Mischung vorzunehmen, da der Agar mit der Hefe bei 100° nur schwer in Lösung geht. Sterilisieren der schwach sauren Flüssigkeit mit Normalnatronlauge bis zum Lackmusneutralpunkt, Alkalisieren mit Normalsodalösung bis zur Rötung des Phenolphthaleins, schließlich Zusatz von 1·6 cm³ Normalsalzsäure. Beim Beschießen der Kulturschalen mit dem zweckmäßig auf annähernd 60° abgekühlten Nährboden ist durch sorgfältiges Umschütteln besonders dafür Sorge zu tragen, daß der Bodensatz nicht zurückbleibt.

Der so erhaltene Nährboden ist milchig getrübt, von grauweißer Färbung, etwa wie eine *Loeffler*-Serumplatte.

Wagner benutzte den Hefeagar zur Gewinnung von Choleraimpfstoff.

β) Nach *Will-Guggenheimer*: *Guggenheimer* empfiehlt den Ersatz des teuren Fleischwassers durch das billigere Hefewasser nach der Vorschrift von *Will**. Für 10 l Hefewasser nimmt man 2·5 kg gut gewaschene, vom Wasser durch Ablaufenlassen und besonders von Hopfenharzen befreite untergärige Bierhefe, hierzu 4 l Leitungswasser, bringt das Gemisch unter häufigem Umrühren zu einmaligem kurzen Aufkochen und gibt hernach 5 l kaltes Leitungswasser zu. Auf diese Weise setzt sich die Hefe leicht ab; die überstehende Flüssigkeit, das Hefewasser, wird nach dreistündigem Stehenlassen abgehebert und filtriert. Das klare Hefewasser wird nun in derselben Weise wie Fleischwasser durch Zusatz von 1% Pepton und 0·5% NaCl zu Hefewasserpeptonagar weiter verarbeitet.

* *H. Will*, Anleitung zur biologischen Untersuchung und Begutachtung von Bierhefe, Bier und Brauwasser zur Betriebskontrolle sowie zur Hefereinzucht. München 1909, S. 445.

Für die Impfstoffbereitung verwendete *Guggenheimer* nur Hefewasserpeptonagar; das Wachstum von Typhus und Agar soll besser sein als auf Agar, der mit *Liebig's* Fleischextrakt hergestellt ist. Auch für die Bereitung der Spezialnährböden soll sich Hefewasserpeptonagar eignen.

γ) Nach *Gaßner*: Die Bereitung der Hefebouillon aus Breihefe, d. h. aus dem Hefebodensatz der Gärbottiche der Brauereien, geschieht in folgender Weise. 10 l Breihefe werden in einem etwa dreimal so großen Behälter dadurch gut ausgewaschen, daß man Wasser zugibt, umrührt, etwa $\frac{1}{2}$ Stunde abstehen läßt und das über dem Hefesatz stehende Wasser abschüttet. Der Waschprozeß wird so oft wiederholt, bis das abgeschüttete Wasser nicht mehr braun, sondern hell-trübe ist; ein fünfmaliger Wasserwechsel ist meist ausreichend. Nach dem letzten Wasserwechsel wird die zurückbleibende Hefe mit Wasser auf 18 l aufgefüllt; dann wird, genau wie zur Erzielung der Fleischbouillon, im Autoklaven oder Dampftopf aufgekocht. Man läßt dann zweckmäßig absetzen, hebert die über dem Bodensatz stehende Flüssigkeit ab oder filtriert durch Filtrierpapier. Die erhaltene Hefebouillon stellt eine hellbräunliche, sehr angenehm riechende Flüssigkeit dar, die in derselben Weise verwendet wird wie Fleischbouillon. Hefewasser ist besser geeignet für Spezial-Typhusnährböden als Fleischextraktwasser, weil es keine störenden Zuckerverbindungen enthält.

Preßhefe, Dauerhefe und Nährhefe sind dagegen nach Ansicht von *Gaßner* zur Herstellung von Bakteriennährböden ungeeignet.

Eine von *Jötten* vorgenommene umfangreiche Nachprüfung der *Gaßnerschen* Hefenährböden ergab im wesentlichen eine Bestätigung ihrer Brauchbarkeit; als einen absolut vollwertigen Ersatz für die Fleischbouillon vermag er sie jedoch nicht zu bezeichnen.

Die Firma E. Merck in Darmstadt bringt die von *Gaßner* empfohlene Breihefe getrocknet in einer gebrauchsfertigen Form in den Handel (Faex medicinalis siccata pulv.). 10 g des Trockenpräparates genügen für 1 l Hefewasser (*Reiter*). Nach *E. Friedmann* wird dieses Hefewasser durch Watte- und Papierfiltration nicht genügend geklärt, dagegen gelingt die Klärung mit kolloidaler Eisenlösung (Liquor ferri oxychlorati) innerhalb kurzer Zeit.

δ) Nach *Kreßler*: *Kreßler* empfiehlt die Verwendung eines von der Firma Apotheker G. Stock, Nahrungsmittelfabrik zu Bernstadt in Schlesien hergestellten Hefekraftextraktes. Zur Herstellung desselben wird nach *Schrumpf* eine Branntwein-Bäckereihefe benutzt. Der Hefekraftextrakt wird nur aus dem flüssigen Inhalt der Hefezellen hergestellt. 100 kg frischer Hefe ergeben 20 kg Hefeextrakt.

Der Hefekraftextrakt ähnelt in seiner tiefbraunen, zähen, klebrigen Beschaffenheit, im Geruch und im Geschmack, sowohl in Substanz wie in Lösung dem *Liebig'schen* Fleischextrakt. In seiner chemischen Zusammensetzung weicht der Hefekraftextrakt von dem *Liebig'schen* Fleischextrakt erheblich ab. Trotzdem eignet er sich sehr gut in 1%igen

Lösungen zur Herstellung von Bakteriennährböden. Von einem Kochsalzzusatz zu den Nährböden wurde in Anbetracht des den Extrakten eigenen hohen Kochsalzgehaltes abgesehen. Bei der Bereitung von Nährbouillon und Nähragar konnte eine Neutralisation in der Regel unterbleiben, da die Hefeextrakte fast stets lackmusneutrale Lösungen ergaben; bei Nährgelatine war natürlich eine Neutralisation erforderlich.

Die aus Hefeextrakt bereiteten Nährböden sind nach *Kreßler* sehr gut brauchbar für die Züchtung der verschiedensten Bakterienarten. Insbesondere soll sich der Hefeextrakt zur Herstellung der für die Typhus-, Koli-, Ruhrgruppe erforderlichen Spezialnährböden eignen. *Jötten* erzielte mit nach *Kreßler* hergestellten Hefeextraktnährböden keine befriedigenden Ergebnisse.

Auch *Ickert* bezeichnet den Hefeextrakt der Firma *Stock* als einen brauchbaren Ersatz für Fleischextrakt. Gleichfalls gute Erfahrungen wurden von ihm mit Preßhefe, wie sie der Bäcker benutzt, gemacht. Zur Herstellung von 1 l Hefewasser genügen 30 g Preßhefe; man läßt das Gemisch eine Stunde ziehen, kocht 2 Stunden auf, klärt mit Liquor ferri oxychlorati und filtriert. Ein Zusatz von 1% Pepton und 0.5% Kochsalz ist unbedingt erforderlich.

ε) Nach *Kammann*, der aus Hefe ein Pepton und einen Extrakt nach einem patentierten Verfahren in folgender Weise darstellt:

Zur Herstellung von Hefepepton werden 10 kg Hefe (Branntwein-, Getreide-, Preßhefe) mit ca. 20 l Wasser 2 Stunden im Autoklaven bei $1\frac{1}{2}$ —2 Atmosphären Überdruck behandelt; nach dem Erkalten wird die die Extraktivstoffe enthaltende Lösung abgehebert bzw. abfiltriert und zurückgestellt. Die dickflüssige, weißliche Hefemasse wird je nach dem Eiweißgehalt der Hefe mit soviel einer gut wirkenden, 0.5% Salzsäure enthaltenden Pepsinlösung versetzt, so daß die völlige Peptonisierung der Hefeeiweißstoffe gesichert ist. Die gesamte zugesetzte Flüssigkeit soll etwa 10 l betragen. Bei öfterem Umschütteln wird die Hefe mit der salzsäurehaltigen Pepsinlösung 4—5 Tage bei 37° im Thermostaten gehalten. Nach dieser Zeit ist das gesamte abbaufähige Hefeeiweiß peptonisiert und die überstehende braune Flüssigkeit enthält in gelöster Peptonform alle abbaufähigen Hefeeiweißstoffe. Die Lösung wird abgehebert oder abfiltriert, mit Natronlauge neutralisiert und bei Temperaturen nicht über 50° im Luftstrom oder im Vakuum zum Trocknen gebracht. Das Trockengut wird zur Entfernung der letzten Spuren Feuchtigkeit eine Stunde bei 100—105° erwärmt und hierauf in der Kugelmühle staubfein gemahlen. Es stellt ein gelblichweißes, in Wasser leicht lösliches Pulver dar, das alle Peptonreaktionen gibt und gebrauchsfertig ist.

Sollen Extraktnährböden hergestellt werden, wird wie folgt verfahren: 10 kg Hefe werden wie oben mit ca. 20 l Wasser 2 Stunden im Autoklaven bei $1\frac{1}{2}$ —2 Atmosphären Überdruck behandelt und nach dem Erkalten die die Extraktivstoffe enthaltende Lösung abgehebert bzw.

klar filtriert und zurückgestellt. Dann wird die zurückbleibende Hefemasse genau wie oben zur Darstellung des Peptons benutzt. Nach 4—5tägigem Verweilen im Thermostaten bei 37° wird abgehebert und abfiltriert, mit Natronlauge neutralisiert, diese die Peptone enthaltende Lösung mit der die Extraktivstoffe enthaltenden Lösung vereinigt und im Luftstrom bei Temperaturen bis zu 50° oder im Vakuum zur Trockne gebracht. Das Trockengut wird in der Kugelmühle gemahlen nach vorheriger einstündiger Trocknung bei 100—105° und stellt ein rötlich-gelbes, feines Pulver dar von angenehm aromatischem Geruche. Es soll nach Angabe des Herstellers in dieser Form für jeden Extraktnährboden oder jede Extraktnährlösung geeignet sein.

Die Nährbodenherstellung selbst erfolgt folgendermaßen:

1. Hefepeptonlösung (Ersatz für Nährbouillon): In 1 l Wasser werden 10 g Hefepepton, 8 g Kochsalz, 0.1 g Kaliumnitrat und 0.2 g kristallisiertes kohlensaures Natron in der Wärme gelöst; die Lösung wird filtriert, in Kölbchen abgefüllt und an drei aufeinanderfolgenden Tagen je eine Stunde im Dampftopf sterilisiert.

2. Hefeextraktagar (Ersatz für Fleischwasseragar): 1 l Wasser werden 6 g Hefepepton und Extraktivstoffe (Pulver), 3 g Kochsalz und 22 g Agar zugesetzt. Man läßt das Ganze mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde im Dampftopf kochen. Darauf erfolgt durch 10%ige Sodalösung die Einstellung auf einen Alkalescenzzgrad von 0.05—0.07%. Dann wird der Agar für einige Stunden in den Dampftopf zurückgebracht und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um die Klärung durch Absetzen eines Bodensatzes herbeizuführen. Der Bodensatz wird abgeschnitten, der klare Agar in Kolben verteilt und diese 1½ Stunden lang an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf sterilisiert.

Die aus Hefepeptonwasser hergestellten Nährböden zeitigten bei einer von Jötten angestellten Nachprüfung recht befriedigende Ergebnisse. Die von Hefepeptonagar gewonnenen Typhus- und Choleraimpfstoffmengen blieben nur um ein geringes hinter den von Fleischwasseragar gewonnenen Impfstoffmengen zurück. Die Unterschiede gegenüber letzteren waren nur unerheblich, so daß nach Jötten zur Impfstoffbereitung bei Fehlen der erforderlichen Fleischmengen diese durch Hefepepton ersetzt werden können.

Weniger günstig waren die Ergebnisse, die Jötten mit den Extraktnährböden zu verzeichnen hatte. Während auf den gewöhnlichen Fleischwassernährböden selbst bei sehr geringer Keimaussaat noch eine üppige Keimentwicklung festzustellen war, konnte auf den Hefepplatten ein auffallend schlechtes Wachstum beobachtet werden. Beachtenswert ist ferner, daß die mit verschiedenen Extraktproben erzielten Resultate nicht gleichmäßig waren.

η) Nach Jötten, der wie Gaßner untergärige Bierhefe verwendete.

Der Gang der Hefeverarbeitung gestaltete sich folgendermaßen: 10 kg untergärige Bierhefe werden mit ca. 20 l Wasser angerührt und zweimal kurze Zeit gewaschen, womöglich unter Zuhilfenahme einer großen Zentrifuge. Zur Entfernung der vorhandenen Bitterstoffe und Hopfenharze wird dann $\frac{n}{1}$ -Natronlauge oder kohlensaures Ammonium ca. 1.5 g in dünnem Strahl bei kräftigem Umrühren zugesetzt, bis die gewöhnlich vorhandenen Hefeflocken verschwinden und die ganze Masse eine dunklere, braune Verfärbung angenommen hat. Das Gemisch läßt man $\frac{1}{2}$ —1 Stunde stehen, in welcher Zeit die Harze und Bitterstoffe gelöst sind, und gibt frisches, kaltes Leitungswasser zu, wodurch eine Ausflockung der Hefe und gutes Absetzen hervorgerufen wird. Nach einigen Stunden hat sich der Hefebrei abgesetzt, die überstehende Flüssigkeit wird abgehebert und der zurückbleibenden Hefemasse nochmals frisches Wasser zugesetzt. Nach öfterem Umrühren wird die gesamte Hefeflüssigkeit in Fünfliterkolben abgefüllt und für 48 Stunden in einen Brutschrank von 45° gebracht, wodurch eine energische Autolyse hervorgerufen wird. Nach Ablauf dieser Zeit hat sich ein Sediment abgesetzt mit darüberstehender brauner Extraktlösung. In den Hefezellen sind nach ausreichender Selbstverdauung keine Plasmaelemente mehr enthalten. Die braune Extraktlösung wird abgegossen und zurückgestellt, der Bodensatz ordentlich mit Wasser ausgezogen und abzentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wird mit der erstgewonnenen Extraktlösung zusammengegossen und ergibt ca. 35—40 l. Diese werden im *Faust-Heim*-schen Trocknungsapparat bis zur dickflüssigen fleischextraktähnlichen Konsistenz eingedickt und können so gebrauchsfertig aufbewahrt werden.

Bei sofort erforderlicher Nährbodenbereitung wird dagegen die zusammengegossene Hefeflüssigkeit in der Weise weiterbehandelt, daß sie im Dampftopf ca. $1\frac{1}{2}$ Stunden gekocht wird; die noch in ihr enthaltenen Hefeschwebeteile haben sich dann am Boden oder an den Wänden des Gefäßes niedergeschlagen. Die goldgelbe bis bräunliche, wie Fleischbrühe aussehende Hefeextraktlösung wird durch Watte oder Filtrierpapier filtriert, was sehr rasch und ohne größeren Zeitverlust vor sich geht. Darauf erfolgt die Einstellung der meist leicht sauren Lösung auf den Lackmusneutralpunkt, sodann ein Zusatz von 8 g Kochsalz, 0.1 g Kaliumnitrat und 0.2 g krystallisiertem Natriumcarbonat pro Liter in der Wärme und Sterilisierung an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Zur Herstellung von Agarnährböden werden noch 22 g Agar pro Liter hinzugefügt.

Auf den nach *Jötten* hergestellten Hefenährböden — Bouillon, Gelatine, Agar — ist das Wachstum der Bakterien, auch der etwas anspruchsvolleren Ruhr- und Cholerakeime, durchaus befriedigend und in jeder Beziehung mit den auf Fleischwassernährböden übereinstimmend. Insbesondere hatte *Jötten* gute Erfolge bei Verwendung von Hefeagar zur Herstellung von Typhus- und Choleraimpfstoff.

n) Ersatz des Peptons durch Tropon nach *Bitter*. Empfohlen werden Eisen- und Malztropon, da reines Tropon zurzeit nicht hergestellt wird. Statt 1% Pepton sind den Nährböden 2% Eisen- bzw. Malztropon zuzusetzen. Mit Tropon hergestellte Nährböden wie Bouillon-, Gelatine-, Agar- und Spezialnährböden zum Nachweis von Typhusbacillen geben nach *Bitter* gute Resultate. Nach meinen Untersuchungen bleibt die Leistungsfähigkeit des Eisentroponagars hinter der des Peptonagars und die des Malztroponagars hinter der des Eisentroponagars zurück.

o) Peptonselfbereitung nach *Frieber*.

In einen Emailletopf von etwa 70 l Innenraum gibt man 20 kg Fibrin, bis zu 60 l Wasser und 400 cm³ konzentrierte Salzsäure (1·19), sodann nach gutem Mischen 30—40 g Pepsinum germanicum Witte. Wenn durch öfteres Umrühren für eine gute Durchmischung gesorgt wird, so ist bei Zimmertemperatur am nächsten Tage das Fibrin größtenteils, nach 2 Tagen vollständig gelöst. Diese schwach saure Verdauungsflüssigkeit, die etwa das spezifische Gewicht von 1·016—1·020 hat, kann in dieser Form als Peptonstammlösung in der gleichen Weise wie Blutserum durch Zusatz von 1% Chloroform und Toluolüberschichtung monatelang aufbewahrt werden, falls man durch häufiges Schütteln der Flasche für gute Verteilung der Antiseptica sorgt und durch dichten Verschuß ihr Verdunsten verhindert. Ferner muß, um eine Säurehydrolyse zu vermeiden, vor Zusatz des Chloroforms die Säure neutralisiert werden.

Zwecks Herstellung der ca. 1%igen Peptonlösung verdünnt man die konservierte oder die frische konzentrierte Stammlösung etwa dreifach mit Wasser und macht die Reaktion durch Zusatz von etwa 5%iger Natronlauge lackmusneutral, wodurch eine bald grobflockig werdende Fällung entsteht. Die Flüssigkeit wird nun gekocht und stellt, nachdem sie durch Filtration oder Absetzenlassen des Niederschlages geklärt ist, eine hellgelbe, ca. 1%ige Pepsinlösung dar, die in dieser Form, in Kolben sterilisiert, unbegrenzt lange aufbewahrt werden kann.

p) Peptonselfbereitung nach *Bramigk*.

Ein Eimer Blutgerinnsel vom Schlachthof wird in fließendem Wasser gewaschen, und so vom Blute befreit. Hierauf wird es gut ausgepreßt, und in folgende Lösung gebracht: 3 l Wasser + 15 cm³ konzentrierte Schwefelsäure, in welcher sie über Nacht verbleiben.

Am anderen Morgen läßt man das Fibrin auf einem Siebe abtropfen und drückt es gut aus; darauf kommt es in eine auf ca. 50° erwärmte Mischung von 3 l Wasser + 18 cm³ Schwefelsäure. Diesem Gemisch wird folgende auf 35° erwärmte Zubereitung zugesetzt: Von zwei frischen Schweinemagen wird die Schleimhaut abpräpariert, kleingeschnitten und über Nacht in einem Gemisch aus 1 l Wasser + 8 cm³ Schwefelsäure stehen gelassen. Das Gemisch bleibt zur Verdauung 48 Stunden bei 37° stehen. Dann wird koliert, die Kolatur aufgeköcht und entweder

mit Ammoniak neutralisiert und in kleine Gefäße abgefüllt und sterilisiert, oder mit Bariumhydroxyd ca. 40 g neutralisiert und dann so lange gekocht, bis die überstehende Flüssigkeit klar ist. Man läßt absetzen und neutralisiert, falls Bariumhydroxyd im Überschuß, mit Schwefelsäure bis zur ganz schwach sauren Reaktion. Durch Dekantieren wird die erhaltene Lösung geklärt, der Rest filtriert und der Rückstand auf dem Filter mit Wasser ausgewaschen. Es ergibt eine hellgelbe klare Lösung, die ca. 10% Pepton enthält.

Will man trockenes Pepton erhalten, so wird die erhaltene Lösung eingedampft und im Exsiccator getrocknet.

Auf diese Weise hergestelltes Pepton erwies sich als dem *Witte*-Pepton gleichwertig.

Zusammenfassend läßt sich über die vorstehend aufgeführten, zahlreichen Ersatzpräparate sagen, daß ein großer Teil von ihnen recht gute Nährböden liefert, die für viele Zwecke, insbesondere zur Herstellung von Impfstoffen, wohl geeignet sind, daß aber zumeist mit ihnen ein den Fleischwasser- und Peptonnährböden durchaus gleichwertiger Ersatz nicht zu erzielen ist. Immerhin schien es angezeigt, den Ersatzpräparaten hier einen breiteren Raum zu widmen, da wir mit Rücksicht auf unsere wirtschaftliche Lage gezwungen sein werden, den Ersatzpräparaten auch weiterhin unsere Aufmerksamkeit zu schenken.

6. Zusätze zu Fleischwassernährböden.

Die zuvor beschriebenen Nährböden erhalten, wenn sie bestimmten Zwecken dienen sollen, gewisse Zusätze. Insbesondere verwendet man derartige Zusätze, um Nährböden zu gewinnen, die dadurch, daß sie das Wachstum einzelner, in Bakteriengemischen vorhandener Arten begünstigen oder hemmen und somit die Isolierung einer bestimmten Bakterienart erleichtern, zu spezifischen oder elektiven Nährböden werden, oder dadurch, daß sie eine Differenzierung morphologisch und färberisch sich gleich verhaltender Bakterien gestatten, zu Differentialnährböden werden. Ihre Besprechung erfolgt in den entsprechenden Kapiteln. Hier seien nur die wichtigsten, auch allgemeinen Zwecken dienenden Zusätze erörtert.

Traubenzucker kann sowohl zu Nährbouillon wie Nährgelatine und Nähragar zugesetzt werden. Hierbei ist zu beachten, daß Traubenzucker — dasselbe gilt auch für alle anderen Zuckerarten — durch längeres Kochen immer mehr zersetzt wird. Es darf daher der Zusatz des Zuckers erst zu dem bereits fertigen Nährboden erfolgen. Man geht deshalb am zweckmäßigsten in der Weise vor, daß man den Zucker in einer kleinen Menge Wasser auflöst, die Lösung kurze Zeit für sich auf dem Wasserbade oder im Dampftopfe sterilisiert und alsdann dem Nährboden zusetzt.

Die Menge des zuzusetzenden Traubenzuckers ist keineswegs gleichgültig. Die Untersuchungen, insbesondere von *Th. Smith* haben gezeigt,

daß ein Gehalt der Nährböden von mehr als 0.5% Traubenzucker für viele Bakterienarten schädlich ist, da bei höherem Zuckergehalt infolge der Tätigkeit vieler Bakterienarten aus dem Zucker Säure in solcher Menge gebildet werden kann, daß die Bakterien nicht nur nicht gedeihen, sondern sogar abgetötet werden.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß die aus Fleischwasser hergestellten Nährböden sehr häufig schon an sich Traubenzucker enthalten, u. zw. infolge des Umstandes, daß das Fleisch in den meisten Fällen Traubenzucker (Muskelzucker) enthält. Auf diese Tatsache und ihre Bedeutung für die Bakteriologie haben *Péré* und *Th. Smith* hingewiesen. Letzterer hat festgestellt, daß in 75% der Fälle in dem benutzten Rindfleisch Muskelzucker enthalten ist, dessen Menge im Fleisch zwischen Spuren und 0.3% schwankt. Will man für bestimmte Zwecke Nährböden herstellen, die vollkommen zuckerfrei sind, so muß man sich eines von *Péré* angegebenen Verfahrens bedienen, das darin besteht, daß zur Herstellung von Fleischwasser kein frisches, sondern etwas älteres Fleisch benutzt wird. Man läßt das Fleisch 40—48 Stunden bei 10—13° hängen und stellt dann erst den Nährboden her. In solchen Nährböden rufen, wie *Péré* feststellen konnte, Bakterien, die Traubenzucker unter Säurebildung zerlegen, keine Säuerung mehr hervor, während in Nährböden, die aus frischem Fleisch gewonnen waren, Säurebildung erfolgt. Es ist also durch die längere Aufbewahrung des Fleisches der Muskelzucker umgesetzt. Das gleiche Verfahren ist auch von *Spronck* empfohlen worden. *Smith* suchte das gleiche Ziel in anderer, etwas umständlicherer Weise zu erreichen. Er beimpfte das aus frischem Fleisch hergestellte Fleischwasser mit *Bacterium coli*, das Traubenzucker kräftig angreift, und ließ die Bakterien über Nacht bei Brutschranktemperatur auf das Fleischwasser einwirken. Erforderlich ist jedoch eine weitere Kontrolle an den fertigen Nährböden durch Einimpfung geeigneten Bakterienmaterials, ob tatsächlich der Nährboden zuckerfrei ist. Völlig zuckerfrei ist nach der Angabe von *Smith* das Fleisch schlecht genährter (tuberkulöser) Rinder. Nährböden, denen Agar zugesetzt ist, lassen sich nicht völlig zuckerfrei herstellen, da beim Kochen des Agars, der, wie oben ausgeführt wurde, reichlich Kohlehydrate enthält, stets geringe Mengen Zucker abgespalten werden.

Milchzuckerzusatz erfolgt in derselben Weise wie Traubenzucker. Es ist darauf zu achten, nur chemisch reine Präparate zu verwenden. In der Jetztzeit ist es allerdings sehr schwer, im Handel Milchzucker zu erhalten, der nicht Traubenzucker in mehr oder minder großen Mengen enthält. Es ist daher notwendig, in jedem Falle Milchzucker auf derartiges Vorhandensein von Traubenzucker alsbald zu prüfen, um sich vor unliebsamen Überraschungen bei Differentialnährböden zu bewahren.

Durch Zusatz von Glycerin wird bei vielen Bakterienarten (Tuberkelbacillen z. B.) ein besseres Wachstum erzielt. Besondere Vorichtsmaßregeln sind bei diesem Zusatz nicht zu beachten.

II. Verwendung von Blut zu Nährböden.

Über die Verwendung von Blut als Ersatz von Fleisch zur Herstellung von Fleischwasser ist bereits auf S. 558 u. 559 berichtet worden.

Zusatz von Blut zu fertigen Nährböden, insbesondere zu Agar, schafft zahlreichen pathogenen Bakterien besonders günstige Wachstumsbedingungen. Einzelne Bakterienarten, z. B. der Influenzabacillus, gedeihen nur auf Nährböden, denen Blut zugesetzt wird. Der mit Blut versetzte Nährboden stellt somit einen Elektivnährboden für die betreffende Bakterienart dar. Abgesehen hiervon lassen Blutnährböden sich auch zur Differenzierung von Bakterien verwenden, da manche Bakterienarten eine Auflösung des Hämoglobins und zum Teil eine Veränderung des Blutfarbstoffs bewirken, während andere nahe verwandte Arten den Nährboden unverändert lassen.

Das zur Herstellung von Blutnährböden erforderliche Blut kann vom Menschen oder von einer Tierart gewonnen werden. In jedem Falle ist, falls nicht die weitere Verarbeitung des Materials eine Sterilisierung mittels Hitze gestattet, sterile Entnahme Bedingung. Dies geschieht beim Menschen in der Weise, daß man nach Stauung des Armes mittels einer Binde und nach Jodanstrich mit einem sterilen Troikart die Vena mediana ansticht und das ausfließende Blut in einer weithalsigen Flasche, an deren Boden sich Glasperlen befinden, unter leichtem Schütteln der Flasche auffängt. Nach der Entnahme des Blutes wird die Flasche mit einem Glasstopfen verschlossen und kräftig geschüttelt, bis das Blut defibriniert ist. Dieses kann alsdann als Zusatz zu Nährböden verwendet werden. Es läßt sich, wenn es wirklich steril entnommen und aufgefangen wurde, mehrere Tage auf Eis gebrauchsfertig aufbewahren. Man kann das Blut auch in einer 1·5%igen Natrium citricum-Lösung auffangen, wodurch eine Gerinnung des Blutes verhindert wird.

Sind nur wenige Tropfen Blutes, z. B.: für eine Einzeluntersuchung, erforderlich, so kann man nach dem Vorgange von *Schottelius* verfahren, indem man nach Reinigung der Nagelgliedseite eines Fingers mit etwas Alkohol auf die Haut ein Tröpfchen Kollodium bringt, hierauf einige Schleuderbewegungen mit dem Arm nach unten ausführt, um das Blut in Hand und Fingern zu stauen, und dann den Finger von der Basis her schnell mit einer schmalen Binde bis hinauf zum Nagelglied umwickelt; alsdann sticht man mit einer feinen Capillare durch das Kollodiumhäutchen hindurch ein- oder zweimal in den Finger. Das austretende Blut kann sofort dem Nährboden zugesetzt werden.

Falls die Beschaffung von Menschenblut auf Schwierigkeiten stößt, so kann man nach *Thalmann* den Blutrest von den zur Anstellung der *Wassermannschen* Reaktion eingesandten Blutproben, nachdem das Serum abgegossen ist, verwerten. Der Blutrest kann, falls die Blutentnahme steril erfolgt ist, was allerdings häufig nicht zutrifft, einige

Wochen aufbewahrt werden; nach mehreren Tagen färbt sich das Serum beim Schütteln mit dem Blutkuchen rot. Von diesem bluthaltigen Serum erfolgt der Zusatz zu dem Nährboden.

Bei der Blutentnahme von Tieren ist die Gefahr einer bakteriellen Verunreinigung wesentlich größer, da eine sichere Desinfektion der Punktionsstelle kaum möglich ist und eine Verunreinigung durch die der Haut und den Haaren oder den Federn anhaftenden, oft sehr resistenten Bakterien (Erdbacillen) leicht stattfinden kann. Verhältnismäßig einfach und zuverlässig gestaltet sich die Blutentnahme noch bei Tauben, Hühnern und sonstigem Geflügel, da sich durch Ausrücken der Federn die Punktionsstelle, die zweckmäßig über der Flügelvene gewählt wird, gut freilegen und auch desinfizieren läßt. Bei größeren Tieren — Esel, Pferd, Rind, Schaf, Ziege — erfolgt die Blutentnahme im allgemeinen aus der Vena jugularis. Auch hier läßt sich durch geeignetes Vorgehen das Blut keimfrei gewinnen, wenn man einen sterilen Troikart verwendet und das zuerst abfließende Blut, das am ehesten verunreinigt sein kann, nicht auffängt. Bei kleineren Tieren, wie Kaninchen und Meerschweinchen, kann man unter Beachtung der gleichen Kautelen durch Herzpunktion genügende Blutmengen erhalten. Kaninchen müssen zu diesem Zweck auf ein Brett gespannt werden, während Meerschweinchen von einem Gehilfen gehalten werden.

Zur Vermeidung häufiger Blutentnahme ist es erwünscht, das Blut längere Zeit in gebrauchsfähigem, d. h. sterilen Zustande aufzubewahren. Das kann ohneweiters im Eisschrank geschehen, wenn nur die Entnahme des Blutes steril erfolgt war. Besonders geeignet zur Aufbewahrung ist in Natrium citricum-Lösung aufgefangenes Blut.

Um das Auskeimen akzidenteller Verunreinigungen im Blute zu verhindern, haben *Bernstein* und *Epstein* folgendes Verfahren angewendet: 400 cm^3 möglichst frisches Rinderblut werden mit 30 cm^3 einer 1%igen Lösung von Ammoniumoxalat in destilliertem Wasser und 1 cm^3 35%iger Formaldehydlösung in einem Kolben vermischt, geschüttelt und nach einer halben Stunde in kleine Flaschen mit der gleichen Menge Kochsalzlösung versetzt. Nach 1—2 Tagen kann dieses Blut als Zusatz zu Nährböden Verwendung finden. Der Formalingehalt der Blutmischung ist so gering, daß eine schädliche Beeinflussung des Bakterienwachstums nicht stattfindet. Zu dem gleichen Zwecke versetzt *Cantani* das Blut mit gleichen Teilen Glycerin. Bakterien, die etwa in dem Blute vorhanden sind, gehen in diesem Blutglycerolat innerhalb einiger Zeit zugrunde. Nach *Poppe* kann jedoch auf Keimfreiheit in derartigen Blutgemischen erst nach mehreren Monaten gerechnet werden.

Die genannten Verfahren sind jedoch entbehrlich, wenn bei der Blutentnahme mit der erforderlichen Sauberkeit vorgegangen wird, so daß eine Verunreinigung des Blutes ausgeschlossen ist. Die Praxis hat

gelehrt, daß derartig entnommenes Blut sich genügend lange im Eisschrank in durchaus brauchbarem Zustande aufbewahren läßt.

Der Zusatz des Blutes zu dem Nährboden kann in verschiedener Weise erfolgen. Zumeist wird gewöhnlicher Agar hierfür gewählt. Will man das Blut mit dem Agar mischen, so muß der Agar zuvor verflüssigt und alsdann auf 45° abgekühlt werden. Zumeist genügt ein Teil Blut auf 4—5 Teile Agar. Durch Hin- und Herneigen des Röhrchens wird das Blut in dem Agar gut verteilt. Man kann nun den Blutagar in dem Röhrchen schräg erstarren lassen oder ihn zu Platten ausgießen. In vielen Fällen, z. B. bei Influenzabacillen, genügt es, wenn die Agaroberfläche mit wenigen Tropfen Blut bestrichen wird.

Bei den zuvor beschriebenen Blutnährböden erfolgt die Verwendung des Blutes in nativem Zustande. Eine Erhitzung des fertigen Blutnährbodens würde das Bluteiweiß zur Ausfällung bringen und die elektiven Eigenschaften des Blutes sofort zerstören. *L. Heim* konnte nun zeigen, daß Blut sich sterilisieren läßt, ohne daß es zu einer Ausfällung des Eiweißes kommt, wenn man Alkali zusetzt. Es gelingt auf diese Weise, auch Blut, das widerstandsfähige Keime enthält, sicher zu sterilisieren. *Dieudonné* verdanken wir sodann die wichtige Feststellung, daß Zusatz von derartigem, mit Alkali versetztem und erhitztem Blut zu Agar einen Elektivnährboden für die noch auf stark alkalischem Nährboden gedeihenden Vibrionen, insbesondere Choleravibrionen, gibt.

Die Herstellung des *Dieudonné*-Agars geschieht in folgender Weise: Rinderblut wird in großen, Glasperlen enthaltenden sterilisierten Flaschen aufgefangen, defibriert und mit gleichen Mengen Normalkalilauge versetzt; diese Mischung wird drei Viertelstunden lang gekocht und ist dann bei Aufbewahrung in fest verschlossenen Flaschen einige Monate haltbar. Von dieser Blutalkalimischung werden 3 Teile mit 7 Teilen neutralem 3%igen Agar vermischt und zu Platten gegossen. Die Platten müssen wenigstens 24 Stunden stehen und werden dann noch, wenn nötig, durch halbstündiges Einstellen in den Bruttofen getrocknet, ehe sie gebrauchsfähig sind. Über 8—10 Tage alte Platten sollen nicht mehr verwendet werden.

Nicht nur das Blut in toto, sondern auch einzelne Bestandteile desselben können bei der Herstellung von Nährböden Verwendung finden. *R. Pfeiffer* stellte fest, daß das Hämoglobin derjenige Anteil des Blutes ist, welcher den Influenzabacillen für ihr Gedeihen unentbehrlich ist. Das Hämoglobin kann das Blut völlig ersetzen. *R. Pfeiffer* gewann eine konzentrierte Hämoglobinlösung aus Taubenblut in der Weise, daß er frisch entnommenes Taubenblut in einem sterilisierten Glase mit einem großen Überschuß sterilisierter 0.85%iger Kochsalzlösung schüttelte und zur Sedimentierung in den Eisschrank stellte. Der nach 24 Stunden gebildete feinpulverige Bodensatz von roten Blutkörperchen wird noch zweimal mit Kochsalzlösung in der-

selben Weise gewaschen, wobei die überstehende Flüssigkeit jedesmal fortgegossen wird. Aus den gewaschenen roten Blutkörperchen wird mittels nachmaligen Gefrierens und Auftauens oder einfacher durch Schütteln mit einer Spur Äther das Hämoglobin in Lösung übergeführt. Der Äther wird im Vakuum bei niedriger Temperatur verdampft und die zurückbleibende sehr konzentrierte Hämoglobininlösung durch ein Kieselgurfilter gesaugt, wodurch die Stromata zurückgehalten werden. Ein Tröpfchen dieser klaren Auflösung des Blutfarbstoffes, in 0.85% iger Kochsalzlösung auf Agar gebracht, genügt, um die Züchtung der Influenzabacillen ebenso wie auf mit Vollblut beschicktem Agar zu ermöglichen.

Reine Hämoglobinkristalle lassen sich nach der Vorschrift von *Hoppe-Seyler* folgendermaßen herstellen. Defibriertes Blut wird mit 10 Volumina einer Kochsalzlösung vermischt und absetzen gelassen. Nach zwei Tagen wird die helle obenstehende Schicht abpipettiert der dicke Blutkörperchenbodensatz wird mit etwas Wasser in einen Glaskolben gespült und so lange mit gleichen Volumina Äther geschüttelt, bis die Blutkörperchen sich auflösen. Nach kurzem Stehen wird der oben schwimmende Äther abgehoben, die Lackfarbe kalt filtriert und mit $\frac{1}{4}$ Volumen kalten (0°) Alkohols versetzt; bei -5° läßt man einige Tage stehen. Die nun reichlich gebildeten Hämoglobinkristalle können auf dem Filter gesammelt und zwischen Filtrierpapier abgepreßt werden.

Das im Handel erhältliche Hämoglobin ist keimhaltig und schwer löslich. Um derartiges Hämoglobin zu sterilisieren, ist Kochen mit Alkali nach der Vorschrift von *Heim* erforderlich. 10 g werden mit 90 cm^3 destilliertem Wasser und 10 cm^3 etwa 10% iger Kalilauge versetzt und das Gemisch im Dampf sterilisiert. Zu einem Röhrchen mit etwa 7 cm^3 Nährsubstrat gibt man davon ungefähr 1 cm^3 und erhält dann einen für verschiedene Bakterien — Pneumokokken, Vibrionen und andere — wachstumsbegünstigenden Nährboden.

Auch das Hämatin, das bei der Zersetzung des O-haltigen Hämoglobins entsteht, kann in gewissen Fällen das Blut ersetzen. So stellten sich *A. Ghon* und *v. Preyß* zur Züchtung von Influenzabacillen eine Hämatinlösung her, die sie dem gewöhnlichen Agar zusetzten.

Ferner verwendete *Lieberknecht* einen Hämatinagar zur Züchtung von Meningokokken.

III. Verwendung von Blutserum zu Nährböden.

Das Blutserum stellt für verschiedene, auf den gewöhnlichen Nährböden gar nicht oder nur spärlich zur Entwicklung gelangende Mikroorganismen, insbesondere für Tuberkelbacillen, Diphtheriebacillen, Spirochäten u. a. ein ausgezeichnetes Nährsubstrat dar.

Um ein steriles Blutserum zu erhalten, muß die Blutentnahme nach den im vorigen Abschnitt erörterten Grundsätzen erfolgen. Vom Men-

schen stammendes Blutserum ist, von Sonderfällen abgesehen, im allgemeinen entbehrlich. Das erforderliche Blut kann durch Aderlaß oder nach *E. Bumm* aus Nachgeburten, während sie noch im Uterus sitzen, oder aus der Leiche gewonnen werden. Zumeist findet Serum von Tieren Verwendung, von denen es sich bei genügender Aufmerksamkeit steril oder nahezu steril gewinnen läßt. Das durch Venenpunktion gewonnene Blut wird in sterilen Glasgefäßen aufgefangen und sofort in einen Eisschrank gestellt. Das Gefäß darf, sobald die Gerinnung des Blutes beginnt, nicht mehr bewegt werden, weil sonst die Bildung eines festen Blutkuchens gestört und dem Serum eine Menge roter Blutkörperchen beigemischt wird. Die mit Blut gefüllten Gefäße bleiben im Eisschrank stehen, bis sich eine reichliche Schicht von vollkommen durchsichtigem, bernsteingelb gefärbtem Serum über dem Blutkuchen gebildet hat. Zur Beschleunigung der Serumabscheidung kann man den Blutkuchen mit einer mehrere Millimeter dicken, durchlochenden sterilen Messingplatte, die an einem Draht hängend eingeführt wird, beschweren (*A. v. Wassermann*). Das Absetzen des Serums erfolgt im Eisschrank am schnellsten und vollkommensten. Sobald sich genügend Serum abgesetzt hat, wird es vorsichtig mit einer Pipette abgehebert. Hierbei muß vermieden werden, daß rote Blutkörperchen sich von dem Blutkuchen ablösen und in das Serum gelangen. Ist dies dennoch geschehen, so ist das Serum durch Zentrifugieren von den roten Blutkörperchen zu befreien. Von 1 l Blut gewinnt man etwa 400—500 cm³ Serum.

Dort wo Tiere in genügender Zahl zur Verfügung stehen, ist es nicht schwierig, ein für Nährbodenzwecke brauchbares Serum zu gewinnen. Anders liegen jedoch die Verhältnisse, wenn das erforderliche Blut nicht selbst entnommen werden kann, sondern vom Schlachthof bezogen werden muß. Bekanntlich werden beim Schlachten der Tiere nicht nur die Halsschlagadern, sondern auch die Luftröhre durchschnitten. Hierdurch und durch die ganze Art der Gewinnung ist es schwer zu vermeiden, daß in das aufgefangene Blut mehr oder weniger Keime hineingelangen. Es gelingt, auch aus solchem Blute, falls es nicht zu stark und insbesondere nicht durch zu widerstandsfähige Bakterien verunreinigt ist, ein keimfreies Serum zu gewinnen. Verschiedene Verfahren sind hierfür angegeben worden.

Das Serum kann durch Filtration keimfrei gemacht werden. Man bedient sich zu diesem Zwecke der Ton- und Kieselgurfilter oder noch zweckmäßiger des Asbestfilters. Obwohl bei der Filtration einige Eiweiße zurückgehalten werden, scheint das Serum keinerlei Einbuße in seinen Eigenschaften als Nährmedium zu erfahren. Trotzdem ist das Verfahren wenig gebräuchlich.

Mehr in Anwendung ist die von *R. Koch* angegebene diskontinuierliche Sterilisation des Serums an fünf aufeinanderfolgenden Tagen im Wasserbad bei 58° während einer Stunde. Zu diesem Zwecke ist es

empfehlenswert, das Serum zuvor in Röhrchen abzufüllen. Im allgemeinen genügt es, das Serum an drei aufeinanderfolgenden Tagen bei 56—58° während 1—3 Stunden zu halten. Man achte darauf, daß die angegebene Temperatur nicht überschritten wird, da manche Sera beim Überschreiten von Temperaturen von 58° bereits gallertig werden.

Ein brauchbares Verfahren, um ein Serum keimfrei zu machen, ist auch das von *M. Kirchner* angegebene Verfahren. Man versetzt das frische Blutserum mit 2 Volumprozent Chloroform, schüttelt gut durch und läßt das Gemisch in fest verschlossener Flasche mehrere Wochen im Eisschrank stehen. Von Zeit zu Zeit muß die Flasche geschüttelt werden, um das Chloroform mit dem Serum gründlich in Berührung zu bringen. Derartig behandeltes Serum ist jedoch nur für solche Nährböden verwendbar, die nach dem Serumzusatz einer Erhitzung unterzogen werden, damit das Chloroform restlos entfernt wird. Mit Chloroform versetztes Serum, das längere Zeit gestanden hat, eignet sich oft weniger zu Nährboden Zwecken, als frisch entnommenes Serum.

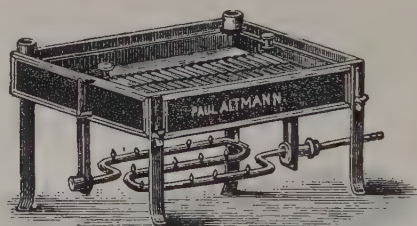
Sowohl die Methode der diskontinuierlichen Sterilisation des Serums nach *R. Koch*, wie die Chloroformmethode nach *M. Kirchner* bewirken Entkeimung nur dann, wenn das Serum nur wenig widerstandsfähige Keime und insbesondere keine Sporenbildner enthält. Sobald letztere bei der Entnahme in das Blut gelangt sind, führen beide Verfahren nicht zum Ziele. Derartige Sera sind alsdann zur Herstellung von Nährböden nicht zu verwenden.

Die Verwendung des Serums zu Nährböden erfolgt in verschiedener Weise. *Ungermann* wies nach, daß steriles, frisch entnommenes Serum ein ausgezeichnetes Nährmedium für verschiedene Spirochätenarten (*Sp. icterogenes*, *Sp. gallinarum*, *Sp. obermeieri*, *Sp. duttoni*) und zur Gewinnung von Dauerkulturen empfindlicher Bakterienarten (Meningokokken, Pneumokokken, Gonokokken, Streptokokken) ist sowie zur Erhaltung der Virulenz tierpathogener Keime (Pneumokokken, Streptokokken, Typhusbacillen, Choleravibrionen). Das Serum wird unverdünnt oder in Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung oder *Ringerscher* Flüssigkeit in geeigneten Kulturröhrchen (*Uhlenhuthsche* Röhrchen) 30 Minuten auf 58—60° erhitzt, dann zum Luftabschluß sogleich mit sterilem Paraffinöl überschichtet und nach genügender Abkühlung beimpft. Am besten bewährte sich aus technischen Gründen und wegen seiner Eigenschaft als Nährboden Kaninchenserum. Indessen können auch andere Serumarten dafür benutzt werden. Besonders gleichmäßige und sichere Resultate erhielt *Ungermann* auf Serum, das von möglichst jungen Tieren gewonnen war. Die Entnahme des Blutes erfolgt bei Kaninchen durch Herzpunktion.

Auf die sonstige Verwendung von flüssigem Serum als Nährmedium insbesondere für Spirochäten wird bei Besprechung der Spezialnährböden zurückzukommen sein.

Zur Isolierung und Züchtung von Tuberkelbacillen verwendete *R. Koch*, nachdem Bouillon und Nährgelatine als Nährboden sich unbrauchbar gezeigt hatten, erstarrtes Blutserum und gewann damit ein das Wachstum der Tuberkelbacillen in hervorragendem Maße förderndes Nährmedium. *R. Kochs* Vorschrift für derartige Serumnährböden gilt auch noch heute. Das Serum wird zunächst mit einer sterilen Pipette zu je 10 cm^3 in Reagensgläser gefüllt. Darauf werden die gefüllten Röhren zur Abtötung von etwa in dem Serum vorhandenen Keimen in der oben beschriebenen Weise an 3—5 aufeinanderfolgenden Tagen im Wasserbade bei 56—58° für 1—3 Stunden gelassen. Das in dieser Weise sterilisierte Blutserum wird hierauf zum Erstarren gebracht, u. zw. um eine möglichst große Impffläche zu erzielen, bei stark geneigter Lage der Reagensgläser. Hierzu bedient man sich zweckmäßig eines mit doppeltem Boden und mit einem Deckel versehenen Blechkastens, welcher ein wenig schräg gestellt wird (s. Fig. 143, welche

Fig. 143



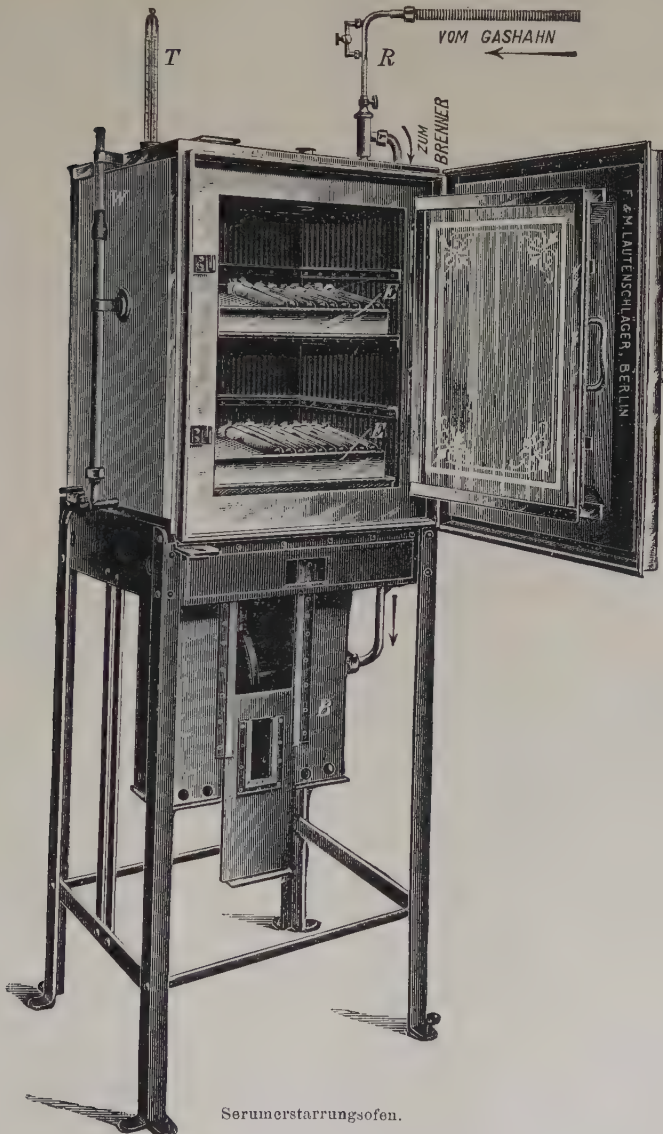
Serumerstarrungsapparat.

den von *R. Koch* angegebenen Apparat darstellt). Die verbesserten Serumerstarrungsapparate ähneln in ihrer Ausführung doppelwandigen Brutschränken (s. Fig. 144). Das in den doppelwandigen Kasten befindliche Wasser wird so stark erhitzt, bis ein in dem Kasten zwischen den Reagensgläsern liegendes Thermometer 65° anzeigt oder das in dem Kasten befindliche Wasser auf 70° erwärmt ist. Bei dieser Temperatur erstarrt das Serum in einer halben bis vollen Stunde. Das Serum verschiedener Tiere verhält sich nicht gleichmäßig: am schnellsten pflegt das Hammelserum, am langsamsten das Kälberserum zu erstarren.

Wenn das Serum stärker erwärmt wird, dann kommt es zwar schneller zum Erstarren, aber es gelingt dann auch schwieriger, dasselbe durchsichtig zu erhalten. Die Herstellung des Serumnährbodens kann dann als gelungen angesehen werden, wenn er nach der Erstarrung bis in die Kuppe des Reagensglases, also bis in die dicksten Partien der Nährbodensäule, durchsichtig geblieben ist und die Konsistenz eines hartgekochten Eies angenommen hat. Es empfiehlt sich, in den Erstarrungsapparat eine offene Schale mit Wasser zu stellen, damit die Innenluft des Apparates genügend feucht bleibt und auf diese Weise

ein Verdunsten des Serums und damit eine mangelhafte Bildung von Kondenswasser verhindert wird. Die Serumröhrchen werden nach er-

Fig. 144.



Serumerstarrungssofen.

folgter Erstarrung und Abkühlung auf 24 Stunden in den Brutschrank gestellt, um sie auf Sterilität zu prüfen.

Bei der Herstellung der Serumröhrchen nach *R. Koch* ist darauf zu achten, daß die zur Erstarrung des Serums erforderliche Temperatur

allmählich erreicht wird, damit sich die von *Öhlecker* und *Burckhardt* sog. Salzhaut auf der Oberfläche des Serums nicht bildet, die die Entwicklung der Tuberkelbacillen ungünstig beeinflussen kann. Das Auftreten einer solchen Salzhaut beobachtet man besonders bei Rinder- und Pferdeserum, weniger bei Hundeserum. Tritt ein schillerndes Häutchen, das später dicker wird, auf, so läßt es sich durch wiederholtes Neigen des Röhrchens mit dem Kondenswasser abspülen (*Dieterlen*).

Nach dem Vorschlage von *Nocard* und *Roux* kann dem Serum bis zu 3% Glycerin zugesetzt werden, wodurch seine Brauchbarkeit als Nährboden für Tuberkelbacillen noch erhöht wird.

Der von *Loeffler* zur Züchtung von Diphtheriebacillen angegebene Elektivnährboden besteht aus einer Mischung von 3 Teilen Kälber- oder Hammelserum und 1 Teil neutralisierter 1%iger Traubenzuckerbouillon. Man füllt die Serumbouillonmischung in Röhrchen oder Petrischalen und läßt sie im Serumofen bei 90—95° erstarren. Die Erwärmung des Ofens muß langsam erfolgen, damit die Bildung von Schaumblasen in dem Nährboden vermieden wird. Die Erstarrung der Serumbouillon muß erfolgt sein, bevor das Wasser in dem Ofen kocht. Bei der Erstarrung der Serumbouillon bildet sich reichlich Kondenswasser, die fertigen Serumplatten müssen daher umgekehrt aufbewahrt werden. Zur Herstellung von *Loeffler*-Serum kann Serum Verwendung finden, das mittels Chloroformzusatzes sterilisiert worden ist. Sporen werden bei der Erhitzung auf 95° nicht abgetötet. Auch bei diesem Nährboden ist die Verwendung von blutigem Serum zu vermeiden, weil sonst der Nährboden, der bei richtiger Herstellung Elfenbeinfarbe zeigen soll, unansehnlich grau wird. Die Traubenzuckerbouillon darf nicht zu stark alkalisch sein, weil sonst der Nährboden weich und braun wird.

Elschnig stellte aus getrocknetem Pferdeserum durch Übergießen von steriler Bouillon ($\frac{1}{3}$ cm³ Trockenserum + 1 cm³ Bouillon) eine Serumbouillon her, die sich zur Züchtung von Streptokokken eignet.

Eine Serumgelatine gewann *R. Koch* durch Mischen von Serum mit gleichen Teilen Gelatine; die Mischung wird fraktioniert bei 52° sterilisiert.

Serumagar besteht aus einer Mischung von Serum und Agar.

Hueppe vermischte Blutserum mit 2%igem Agar zu gleichen Teilen.

Tochtermann hat einen Serumagar angegeben, der in folgender Weise hergestellt wird. Eine Lösung von 2% Agar, 1% Pepton, 0.5% Kochsalz und 0.3—0.5% Traubenzucker wird filtriert, dann mit Hammelblutserum zu gleichen Teilen oder im Verhältnis von 3 Teilen Serum zu 2 Teilen Agar gemischt und gekocht.

Auch das Blutplasma, d. i. die unveränderte Flüssigkeit des Blutes (Serum + Fibrin), findet als Nährmedium Verwendung. Über seine Brauchbarkeit als Ersatz für Fleisch bei der Herstellung von Fleisch-

wasser ist bereits auf S. 560 berichtet worden. Das Blutplasma ist vorzugsweise zur Züchtung von schwer kultivierbaren Mikroorganismen, insbesondere Spirochäten, herangezogen worden. Die Gewinnung von Blutplasma für derartige Zwecke erfolgt in der Weise, daß man Blut in 1%iger Natrium-citricum-Lösung auffängt, die Blutkörperchen sich absetzen läßt und die überstehende Flüssigkeit, das „Salzplasma“, mit steriler Pipette abpipettiert (*Ungermann*).

IV. Verwendung sonstiger tierischer Flüssigkeiten zu Nährböden.

Ascitesflüssigkeit. Die in der Bauchhöhle zumeist infolge von Stauung sich bildende Ascitesflüssigkeit stellt ein flüssiges Transsudat von wasserklarer Beschaffenheit oder von bernsteingelber Farbe und einem spezifischen Gewicht von 1004—1014 dar. Sie enthält wenig oder keine lockeren Fibrinkoagula. Mikroskopisch findet man spärliche Zellen, die teils desquamierte, verfettete oder zerfallende Epithelien, teils gequollene oder Fettkörnchen enthaltende Leukocyten sind. Der Eiweißgehalt der Ascitesflüssigkeit ist ein verschiedener. Nicht jeder Ascites eignet sich zur Herstellung von Nährböden.

Die Entnahme der Flüssigkeit hat unter aseptischen Kautelen zu erfolgen. Es empfiehlt sich, wenn man die Flüssigkeit längere Zeit aufbewahren will, sie in Kölbchen zu 50 oder 100 cm^3 abzufüllen und an drei aufeinanderfolgenden Tagen je eine Stunde bei 56—58° zu halten und alsdann im Eisschrank aufzubewahren.

Verschiedene Bakterien, insbesondere Meningokokken und Gonokokken, gedeihen auf einem Agarnährboden, dem Ascites zugesetzt ist, besonders gut, insbesondere bei ihrer Isolierung aus dem Organismus. Der Zusatz der Ascitesflüssigkeit zum Agar erfolgt im Verhältnis 1 : 3.

Von *Cantani* wird ein Ascitesnährboden empfohlen, auf dem die verschiedensten Mikroorganismen (Meningokokken, Gonokokken, Diphtheriebacillen, Tuberkelbacillen) in hervorragender Weise zur Entwicklung kommen sollen, und der folgende Zusammensetzung hat: 6 Teile Ascites (frisch oder mit gleichen Teilen Glycerin aufbewahrt) werden mit 1 Teil Blutglycerolat (s. S. 571) vermischt; 0.5—0.75 cm^3 dieser Mischung werden zu einem Agar- oder Bouillonröhrchen gesetzt. Die auf diesem Nährboden sich entwickelnden Kulturen nehmen alle eine braune Farbe an.

Hydrocelen- und Cerebrospinalflüssigkeit lassen sich in der gleichen Weise verwenden wie Ascites.

Dadurch, daß man das Eiweiß derartiger Körperflüssigkeiten in ein beim Kochen nicht fällbares Alkalialbuminat überführt, kann man mit ihnen durchsichtige Nährböden herstellen. Nach *Kanthak* und *Stephens* geschieht dies in folgender Weise: Zu je 100 cm^3 der serösen Flüssigkeit, die nicht zu eiweißreich sein darf, gibt man 2 cm^3 10% iger Kalilauge und 1.5% Agar, ferner 1.5—2% Glycerin. Die Mischung wird

in Gläser abgefüllt und sterilisiert. Weitere Angaben über Alkali-albuminatnährböden finden sich in dem Abschnitt Spezialnährböden (Diphtherie, Gonokokken, Tuberkelbacillen).

Milch ist ohne jeden Zusatz ein ausgezeichnetes Nährmedium für zahlreiche Bakterien. Das in der Vollmilch sich findende Fett kann unter Umständen bei der Bakterienzüchtung störend wirken; man verwendet deshalb zweckmäßig Magermilch. Da die Milch oft sehr widerstandsfähige Sporen enthält, so stößt ihre Sterilisierung nicht selten auf erhebliche Schwierigkeiten. Man sterilisiert die Milch, nachdem sie durch ein Leinentuch durchgeseiht ist, in der Weise, daß man sie entweder an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen für kurze Zeit im Dampftopf oder einmalig im Autoklaven bei 120° erhitzt. *v. Hibler* stellt die Milch an drei verschiedenen Tagen für ca. 20 Minuten in den Dampftopf und hält sie in der Zwischenzeit bei 54—60°, während *Günther* für die Zwischenzeit eine Temperatur von 21° vorschlägt. Bei der Sterilisierung im Autoklaven bräunt sich die Milch leicht infolge Karamelisierung des Milchezuckers. Wird die Sterilisation zu weit ausgedehnt, so verändert sich die Milch beim Stehen derart, daß sich eine durchscheinende, molkenartige Flüssigkeit von schwach alkalischer Reaktion bildet, auf deren Grund das geronnene und teilweise peptonisierte Casein liegt.

Milch läßt sich auch, wie *Sterling* gezeigt hat, mit Chloroform sterilisieren. Das Chloroform muß 14 Tage auf die Milch einwirken und wird alsdann durch Erhitzung verjagt.

Versetzt man Milch mit der gleichen Menge Agar oder Gelatine, so erhält man einen festen, jedoch undurchsichtigen Nährboden. Ein solcher Milchagar findet zur Erkennung peptonisierender Bakterien bei Anwendung von Brutschranktemperatur Verwendung: infolge Peptonisierung des Caseins tritt eine Aufhellung des weißen Nährbodens in der Umgebung der betreffenden Kolonien ein (*Eijkman*).

Wird Milch durch Zusatz von Lab bei 40° zur Gerinnung gebracht, so entstehen Molken, die mit Agar oder Gelatine unter Zusatz von Pepton und Kochsalz feste Nährböden geben.

Die Verwendung von Harn als Nährmedium ist kaum noch üblich. Über Harn als Ersatz für Fleischwasser s. S. 560.

V. Verwendung von Eiern zu Nährböden.

Das Vogelei, insbesondere das Hühnerei, kann als Ganzes oder auch in seinen einzelnen Bestandteilen als Nährboden Verwendung finden.

Frische Eier werden nach der Vorschrift von *Hueppe* in folgender Weise in toto als Nährböden für Mikroorganismen verwendet. Die frischen Eier werden äußerlich sorgfältig mit Seife, Wasser und Bürste gereinigt; dann wird die Schale mit Sublimatlösung sterilisiert, mit sterilisiertem Wasser abgespült und mit steriler Watte abgetrocknet. Nun wird an der Spitze des Eies mit ausgeglühter Nadel eine feine

Öffnung gemacht; durch die letztere hindurch wird mit Hilfe des Platindrahtes die Infektion des Eies bewirkt. Darauf bedeckt man die Öffnung mit einem kleinen Stück sterilisierten Seidenpapieres und befestigt dasselbe mit etwas Kollodium an der Eischale, so daß die Öffnung luftdicht verschlossen wird. Der Verschluß kann auch mit einem Tropfen brennenden Siegelackes vorgenommen werden.

Günther reinigt das Ei mit Wasser und Seife, spült mit Wasser (vermeidet die Verwendung von Sublimat) und trocknet. Hierauf wird das glühende Ende eines Kartoffelmessers oder Skapells flach auf die Spitze des Eies aufgelegt. Es entsteht eine sicher sterile Stelle, durch die mit einer ausgeglühten Nadel ein Einstich gemacht wird.

Zörkendörfer benutzt das Ei ohne Schale, aber mit Schonung des Dotters. Zu diesem Zwecke wird das Eiweiß in einen sterilen Erlenmeyerkolben gegossen und der Dotter vorsichtig auf die Mündung gelegt; das Ganze wird in Eiswasser gestellt. Durch den Luftdruck wird der Eidotter in den Kolben hineingetrieben; durch vorsichtiges Blasen kann nachgeholfen werden. Danach Watteverschluß; Sterilisation an mehreren Tagen je 1—2 Stunden bei 56°.

Aus Eiereiweiß läßt sich ein fester Nährboden herstellen, indem man aus gekochten und geschälten Eiern Eiweißstücke ausschneidet und diese in sterilen Reagensgläsern mit Watteverschluß unter Zusatz von einigen Tropfen Wasser gegen Eintrocknung oder in Schälchen im Dampf sterilisiert (*Hesse, Sakharoff*).

Einen flüssigen Nährboden, ähnlich der Nährbouillon, erhielten *Langstein* und *Mayer* aus Eiern auf folgende Weise: das Eiklar von 5 Eiern wird in 500 cm³ siedendes Wasser unter beständigem Umrühren eingetragen und nach schwachem Ansäuern mit Essigsäure nochmals aufgekocht. Nach Filtration des ausgeschiedenen Koagulums wird das Filtrat auf 200 cm³ eingedampft und nach entsprechender Alkalisierung mit Soda in Röhrchen gefüllt und im Dampf sterilisiert. Die Flüssigkeit gewinnt hierbei das Aussehen von Nährbouillon.

Beim Kochen von Eiweißwürfeln in einer Nährlösung gehen, wie *Oberstadt* gezeigt hat, alkalisch reagierende Stoffe über, die das Wachstum verschiedener Bakterien (Pneumokokken, Meningokokken, Streptokokken und Anaerobier) begünstigen. Die Herstellung ist folgende: Eier werden 10 Minuten gekocht und dann geschält; hierauf wird ausschließlich das Eiweiß in etwa erbsengroße Würfelchen geschnitten. Die Würfelchen von einem Ei genügen für 100 cm³ Nährbouillon, die nicht älter als 14 Tage sein darf. Damit werden die fertigen, klaren Nährlösungen 30 Minuten auf 100° erhitzt, dann bis zum nächsten Tage kühl stehen gelassen, filtriert, das Filtrat in Reagensgläser abgefüllt und im Autoklaven $\frac{3}{4}$ Stunden bei $\frac{1}{2}$ Atmosphäre sterilisiert. Anaerobier liefern in einer solchen Bouillon besonders gute Toxine, wenn zu der Bouillon noch ein Eiweißwürfelchen hinzugesetzt wird.

Die von *Besredka* und *Jupille* angegebene *Eibouillon* ist ein guter Nährboden für Pneumokokken, Meningokokken, Gonokokken, Streptokokken, Typhus-, Paratyphus-, Coli-, Maltafieber-, Cholera-, Diphtheriebacillen, Keuchhustenbacillen und Tuberkelbacillen. Die Eibouillon wird in folgender Weise hergestellt: das Eiweiß wird allmählich mit der zehnfachen Menge destillierten Wassers vermischt und geschüttelt, sodann auf 100° erhitzt, durch Papier filtriert und nochmals sterilisiert. Das Eigelb wird gleichfalls mit der zehnfachen Menge destillierten Wassers geschüttelt. Hierauf wird Normalsodalösung hinzugesetzt, wodurch eine schnelle Klärung der Flüssigkeit herbeigeführt wird; im allgemeinen genügt 1 cm^3 Normalsodalösung auf 100 cm^3 der Eigelbaufschwemmung. Erhitzen auf 100° , filtrieren und nochmals sterilisieren. Die Bouillon entspricht der üblichen Herstellung. Um die Eibouillon zu erhalten, mischt man 500 cm^3 Bouillon mit 400 cm^3 Eiweißlösung und 100 cm^3 Eigelblösung. Die Mischung wird auf Röhren verteilt. Für Tuberkelbacillen empfiehlt sich die Verwendung von peptonfreier Bouillon und folgende Zusammensetzung des Nährbodens: 100 cm^3 Bouillon, 20 cm^3 Eiweißlösung und $5\text{--}20\text{ cm}^3$ Eigelblösung.

Zur Bereitung von Eiernährböden nach *Dorset* werden die Eier gründlich mit Wasser gereinigt und darauf mit 5%iger Carbolsäurelösung abgewaschen. Dann werden die beiden Pole in der Flamme getrocknet und mit scharfer, ausgeglühter Pinzette geöffnet. Der Inhalt wird darauf in einen sterilen Erlenmeyerkolben ausgeblasen, 10% des Gewichtes der Eier an Wasser zugefügt und durch Schütteln oder mittels Glasstabes gemischt, ohne daß Bildung von Schaumblasen hervorgerufen wird. Nach Filtration durch ein Sehtuch wird der Nährboden auf Röhren gefüllt und durch Erhitzen auf 70° während $2\text{--}2\frac{1}{2}$ Stunden in wasserdampfgesättigter Luft zum Gerinnen gebracht. Der Nährboden eignet sich vornehmlich zur Isolierung und Züchtung von Tuberkelbacillen.

Die Herstellung der Eigelbnährböden nach *Lubennau* erfolgt in ähnlicher Weise; es kommt jedoch nur das Eigelb zur Verwendung. Nachdem die Eier wie bei *Dorset* gereinigt, schlägt man mit einem sterilen Messer Löcher in die Eipole und läßt zunächst das Eiweiß ablaufen. Hierauf wird das Abflußloch mit einer Pinzette zum Ablassen des Eigelbs erweitert. Mengt sich etwas Eiweiß dem Eigelb bei, so schadet das nichts. Das Eigelb wird in einem sterilen Gefäße aufgefangen und mit Hilfe von sterilen Glasperlen energisch durchgeschüttelt. Erst dann wird Bouillon zugesetzt und durch kräftiges Schütteln vermischt. Als Bouillon wird gewöhnliche, filtrierte, sterilisierte, für Diphtheriebacillen mit 1% Dextrose, für Tuberkelbacillen mit 3% Glycerin versetzte, mit Soda gegen Lackmus neutralisierte Fleischwasserbouillon verwendet. Diese Bouillon wird zu gleichen Teilen mit Eigelb vermenget. Da ein Ei etwa $18\text{--}20\text{ cm}^3$ Eigelb enthält, müssen zu 100 cm^3 Bouillon $5\text{--}6$ Eier verwendet werden. Die Eigelbbouillonmischung wird in Röhren abge-

füllt, die im Serumofen bei 85—90° in wasserdampfgesättigter Luft zum Erstarren gebracht werden.

Nach *Capaldi* erhält man Eigelbnährböden durch Vermischen von fertigem Agarnährboden, bzw. fertiger Nährbouillon mit frischem Eigelb; mehrere Ösen Eigelb genügen für ein Agar-, bzw. Bouillonröhrchen. Der Zusatz von Eigelb bewirkt eine Verbesserung des Nährbodens für viele Mikroorganismen.

Durchsichtige Eiereiweißnährböden lassen sich durch Überführung des Eiweißes in Alkalialbuminat erzielen. Von den hierfür vorgeschlagenen Verfahren seien folgende hier angeführt:

Tarchanow legt Hühnereier für 4 Tage in 10%ige Kalihydratlösung. Hierauf wird das veränderte Eiweiß in Reagensgläser abgefüllt und zur Hälfte mit Wasser verdünnt. Dieses sirupartige Alkalialbuminat erstarrt im strömenden Dampf nicht, dagegen nach 15 Minuten langer Einwirkung von 105° zu einer opaleszierenden, aber noch durchscheinenden Masse. Nach 14tägigem Liegen in der Kalilauge wird das Eiweiß fest und kann in Scheiben geschnitten als Nährboden verwandt werden.

Karlinski läßt die Eier 14 Tage lang in 10—20%iger Kalilauge, nimmt die Schale mit ausgeglühter Pinzette ab und schneidet das Eiweiß mit sterilem Messer in Schalen, die in sterilem Doppelschälchen ohne weiteres als Nährboden Verwendung finden können.

Rosenthal und *Schulz* pressen frisches Eiereiweiß durch Musseline in einen Meßzylinder mit Glasstöpsel und setzen auf je 5 cm³ Eiweiß 3 cm³ einer 1%igen Kali- oder Natronlauge hinzu. Das Gemisch bleibt einige Stunden stehen und wird durch wiederholts Neigen des Zylinders vermischt. Schütteln ist wegen störender Schaumbildung zu vermeiden. Alsdann wird die Mischung in sterile Reagensgläser gefüllt und bei 95—98° im Wasserbade erhitzt, wobei Gerinnung des Eiweißes zu einer durchsichtigen, höchstens leicht opaleszenten Gallerte eintritt. Auf 100° darf der Nährboden nicht erhitzt werden, weil die dann in Blasen entweichenden Wasserdämpfe die Gallerte zerreißen. Der Nährstoffgehalt dieses Nährbodens läßt sich dadurch erhöhen, daß man einen Teil des Wassers durch Bouillon ersetzt.

VI. Verwendung von Kartoffeln und sonstigen pflanzlichen Produkten zu Nährböden.

Die gekochte Kartoffel ist zuerst von *Schröter* als Nährboden in die Bakteriologie eingeführt worden. *R. Koch* hat ihr alsdann ausgedehnte Anwendung verschafft, während heute die Kartoffel als Nährboden wieder mehr in den Hintergrund getreten ist.

Zu Kulturzwecken eignen sich nur gesunde Kartoffeln. Nicht jede Kartoffelsorte ist brauchbar; am geeignetsten sind sog. Salatkartoffeln, die beim Kochen nicht platzen und in gekochtem Zustande zerschnitten keine mehlige, sondern eine feste, glänzende Schnittfläche geben.

Die Vorbereitung der Kartoffeln erfolgt in der Weise, daß man sie unter der Wasserleitung mit einer harten Bürste, einer sog. Kartoffelbürste, zunächst mechanisch von dem äußerlich anhaftenden Schmutze gründlich befreit. Die der Kartoffel anhaftende Erde enthält fast stets sporenbildende Bakterien von ganz erheblicher Resistenz, die möglichst beseitigt werden müssen. Sodann werden mit einem Kartoffelmesser die Vertiefungen der Kartoffeloberfläche, die Augen der Kartoffel, sowie alle schadhafte Teile der Oberfläche ausgekratzt. Die Kartoffeln werden hierauf mit Wasser abgespült und auf $\frac{1}{2}$ —1 Stunde in eine 1‰ige Säuresublimatlösung (1 Sublimat, 5 Salzsäure, 1000 Wasser) gelegt. Nach der Herausnahme aus der Sublimatlösung werden die Kartoffeln mit Wasser gründlich abgespült und im strömenden Dampfe 2 Stunden gekocht. Sind die Kartoffeln abgekühlt, so werden sie mit der linken desinfizierten Hand zwischen Daumen und Zeigefinger gefaßt und mit einem in der rechten Hand gehaltenen ausgeglühten Kartoffelmesser durchgeschnitten, u. zw. so, daß die entstehenden Hälften eine möglichst große Schnittfläche aufweisen. Die halbierten Kartoffeln werden sofort in eine feuchte, sterile Kammer gelegt. Eine solche Kammer besteht aus einem Paar geräumiger Doppelschalen, deren untere einen Durchmesser von ca. 20 cm und eine Höhe von etwa 6 cm hat. Der Boden der inneren Schale wird mit einer mehrfachen Lage von Fließpapier bedeckt, welches mit 1‰iger Sublimatlösung angefeuchtet wird. Eine Doppelschale reicht zur Aufnahme von 4—6 Kartoffelhälften. Sobald die Kartoffel genügend abgekühlt ist, kann sie beimpft werden.

v. *Esmarch* schält die Kartoffeln und beseitigt so von vornherein die bakterienreiche Schale. Die geschälte Kartoffel wird, nachdem sie unter der Wasserleitung abgespült ist, in 1 cm dicke Scheiben zerlegt, die man nach der Größe der zur Aufnahme bestimmten kleinen Doppelschalen von 4—5 cm Durchmesser abrundet. In eine solche Schale kommt je eine Kartoffelscheibe. Die Doppelschale mit der darin liegenden Kartoffelscheibe wird in strömendem Dampf sterilisiert. Derartige fertige Schalen mit sterilisierten Kartoffelscheiben lassen sich leicht vorrätig halten.

Noch handlicher als die *Esmarch*sche Methode ist die Verwendung der Kartoffel im Reagensglase. *M. Bolton* schnitt aus einer geschälten Kartoffel mit einem Apfelbohrer oder einem großen Korkbohrer, dessen Durchmesser etwas kleiner sein muß als der des Reagensglases, zylindrische Stücke von etwa 4—5 cm Länge aus. Zur Erzielung einer möglichst großen Oberfläche wird der Kartoffelzylinder schief abgeschnitten oder nach *Globig* durch einen schrägen Längsschnitt in zwei gleiche Segmente zerlegt, so daß man alsbald Material für zwei Reagensgläser erhält. Zur Aufnahme eines solchen Kartoffelsegmentes verwendet man entweder Reagensgläser nach *Roux*, die unten etwas verengert sind, so daß sich das austretende Wasser am Boden des Glases sammeln kann

und die Kultur nicht berührt und gleichzeitig an der Verengung des Glases für das Kartoffelsegment ein Stützpunkt gewonnen wird, oder man nimmt ein gewöhnliches Reagensglas und gibt auf den Boden desselben etwas sterilisierte Watte (*Hueppe*); oder man bringt ein 2 cm langes Glasstäbchen als Stütze für die Kartoffel auf den Grund des Reagensglases, um die Berührung mit dem Kondenswasser zu vermeiden. Zur Herstellung derartiger Kartoffelkulturen empfiehlt sich die Verwendung roher Kartoffeln.

Die Sterilisation erfolgt nach der Beschickung des Reagensglases im strömenden Dampf in der üblichen Weise. Zweckmäßig ist es, bevor man die Kartoffelkeile in die Reagensgläser bringt, einige Tropfen Wasser in die Röhrchen laufen zu lassen. Dadurch wird verhindert, daß die Oberfläche des Kartoffelsegmentes beim Sterilisieren trocken und für die Beimpfung ungeeignet wird.

Die Reaktion der Kartoffel ist gewöhnlich schwach sauer. Will man eine leicht alkalische Reaktion der Kartoffeloberfläche herstellen, so legt man sie vor der Sterilisierung für 15 Minuten in eine 1%ige Sodalösung. Ebenso läßt sich eine stärker saure Reaktion durch Einlegen in verdünnte Essigsäure erzielen.

Eine andere Verwendung der Kartoffel besteht darin, daß man statt der Kartoffelscheiben zerriebene Kartoffeln nimmt. Zu diesem Zwecke bringt man die gekochten und darauf zerriebenen Kartoffeln in Kölbchen, fügt so viel Wasser zu, daß ein dicker Brei entsteht, und sterilisiert ihm in Dampfapparat. Diesen Kartoffelbrei kann man durch Zusatz von Stärke, Zucker, Pepton, Fleischextrakt zu einem brauchbaren Nährboden für viele Bakterien machen.

Durch Mischen von Kartoffelbrei mit Gelatine oder Agar lassen sich gleichfalls Nährböden herstellen, die dem Nachweis von verschiedenen pathogenen Bakterien dienen können. Näheres hierüber s. im Abschnitt Spezialnährböden, Kapitel Typhus und Keuchhusten.

Als Ersatz für die Kartoffel sind Rüben (Zuckerrüben, Mohrrüben, rote Rüben), Äpfel, Birnen, Artischocken und andere Früchte empfohlen worden. Eingebürgert hat sich indes keiner dieser Ersatznährböden.

Erwähnt sei noch der von *Heinemann* als Ersatz für Kartoffelnährböden angegebene Stärkenährböden. (Näheres s. Kapitel „Differentialnährböden“.)

Weißer Oblaten sind nach *Schill* ein guter Nährboden für Farbstoffbildner; man legt sie in Doppelschalen, befeuchtet sie mit einer Nährlösung und sterilisiert.

Einen Brotbrei stellt man sich in der Weise her, daß man geriebenes Brot mit so viel Wasser im Erlenmeyerkolben mischt, daß beim Sterilisieren ein nicht zu weicher Brei entsteht. Brotbrei ist ein vorzüglicher Nährboden für Schimmelpilze, die auf sauren Nährböden besser gedeihen als auf alkalischen.

Gleichfalls zur Züchtung von Schimmelpilzen eignet sich ein Pflaumendekokt: 100 g getrocknete, entkernte Backpflaumen werden in 500 cm³ destilliertem Wasser $\frac{1}{2}$ Stunde gedämpft. Beim Filtrieren bleibt ziemlich viel Wasser in den Pflaumen, das sich auch durch Pressen nicht herausbringen läßt; man ergänzt es ganz oder nur teilweise durch destilliertes Wasser. Das Filtrat kann für sich als Brühe verwendet oder mit Gelatine oder Agar zu einem festen Nährboden verarbeitet werden.

Die aus Brauereien erhältliche Bierwürze kann als solche flüssig verwendet werden oder als Zusatz zu Gelatine oder Agar Verwendung finden. Bierwürze eignet sich zur Kultur von Schimmelpilzen und insbesondere von Hefen.

Reisscheiben ohne Bouillon empfiehlt *F. Král* zur Züchtung von Hautmikrophyten: 100 g Reispulver werden in einer Reibschale mit 250 cm³ Magermilch innig vermischt, in einer Porzellanschale über einer Flamme unter fortwährendem Bewegen in einen steifen Brei übergeführt; dieser wird in heißem Zustande mittels eines Spatels in einen Kartoffelbohrer derart eingestrichen, daß keine Zwischenräume entstehen. Nach dem Erkalten schiebt man den so erhaltenen Reiszylinder mit dem Bohrerstempel etwas vor, schneidet mit einem bogenartig gefaßten, straff angespannten und möglichst dünnen Platindraht die unebene Kuppe und fortschreitend in gleicher Weise Scheiben von 6—7 mm Dicke ab, die man sofort in kleine Doppelschalen bringt. In jede Schale kommen außerdem noch 8 Tropfen Milch. Hierauf wird 1—1 $\frac{1}{2}$ Stunden im Dampf sterilisiert.

Ein von *Soyka* angegebener Reiskreis wird folgendermaßen hergestellt: 100 Gewichtsteile Reispulver werden mit 210 Maßteilen einer Milchbouillonmischung (3 Teile Milch + 1 Teil Bouillon) vermischt. Die Masse wird in einer Reibschale gleichmäßig verrieben, mit einer Pipette in kleine Doppelschalen gefüllt und sterilisiert. Milch sowohl wie Reis müssen, bevor sie gemischt werden, gesondert sterilisiert werden, um die endgültige Sterilisation innerhalb möglichst kurzer Zeit vornehmen zu können.

VII. Eiweißfreie Nährmedien.

Bei seinen Untersuchungen über die Ernährungsbedingungen von Hefepilzen fand *Pasteur*, daß zum Wachstum dieser Organismen keine Eiweißkörper erforderlich sind, da sie befähigt sind, den für ihre Ernährung und Vermehrung notwendigen Stickstoffbedarf aus Ammoniak zu entnehmen. Die von *Pasteur* angegebene Nährflüssigkeit besteht aus:

- 100 Gewichtsteilen Wasser,
- 10 „ „ reinstem Kandiszucker,
- 1 Gewichtsteil weinsaurem Ammoniak
- und der Asche von 1 Gewichtsteil Hefe.

In dieser Nährlösung dient den Hefepilzen der Zucker als Kohlenstoffquelle und das weinsaure Ammoniak als Stickstoffquelle; die Hefeasche ist notwendig, um den Hefepilzen die zu ihrer Ernährung erforderlichen Mineralsalze zuzuführen. Hefe, die in der *Pasteurschen* Nährflüssigkeit längere Zeit fortgezüchtet wird, degeneriert allmählich, wenn ihr nicht von Zeit zu Zeit Pepton oder andere Eiweißstoffe als Nahrung geboten werden.

Pasteur fand dann weiterhin, daß in seiner Nährflüssigkeit auch Bakterien gut zur Entwicklung gelangen. Die Nährlösung wurde in der Folge von *A. Mayer* dahin geändert, daß er die Hefeasche durch die in ihr enthaltenen wirksamen Salze ersetzte.

Eine weitere Änderung bedeutete die von *Ferdinand Cohn* hergestellte „normale Bakterien-Nährflüssigkeit“. Sie enthält:

- 0.1 g phosphorsaures Kali,
- 0.1 „ kryst. schwefelsaure Magnesia,
- 0.01 „ dreibasisch phosphorsauren Kalk,
- 20 cm³ Aqua dest.,
- 0.2 g weinsaures Ammoniak.

In dieser Nährflüssigkeit ist das Ammoniak die Stickstoffquelle, während die Weinsäure die Kohlenstoffquelle für die Bakterien abgibt.

Uschinsky hat eine eiweißfreie Nährlösung angegeben, auf der zahlreiche pathogene Bakterien zur Entwicklung kommen. Ihr nahe stehen die von *C. Fraenkel* und *Sullivan* hergestellten Nährflüssigkeiten.

	<i>Uschinsky</i>	<i>Sullivan</i>	<i>C. Fraenkel</i>
Wasser	1000	1000	1000
Glycerin	30—40	10	—
Chlornatrium	5	5	5
Dikaliumphosphat	2—2.5	1	2
Ammonium lacticum	6—7	0.5	6
Natr. asparaginicum	3.4	10.0	—
Käufliches Asparagin	—	—	4
Chlorcalcium	0.1	—	Zusatz von verdünnter Natronlauge bis zur deutlich alkalischen Reaktion.
Kaliumnitrat	—	0.2	
Magnesiumsulfat	0.2—0.4	0.2	

Eine ähnliche Zusammensetzung wie die vorgenannten Lösungen hat die von *Maassen* angegebene Flüssigkeit.

Wasser	1000.0
Äpfelsäure	7.0
Asparagin	10.0
Magnesiumsulfat	0.4
sekundäres Natriumphosphat	2.0
krystallisierte reine Soda	2.5
trockenes Calciumchlorid	0.01
Kohlehydrat	0.5—1 %.

Auf diesen Nährlösungen kommen nicht nur saprophytische, sondern auch zahlreiche pathogene Bakterien zur Entwicklung.

Nach *Kuntze* eignet sich für Farbstoffbildner anstatt des Dikaliumphosphats besser das saure Salz (KH_2PO_4).

Galimard und *Lacomme* setzten Harnstoff oder ein oder mehrere Amine, Arginin, Leucin, Tyrosin, Glykokoll od. dgl. zu einer Salzlösung die 0·5% Kochsalz, 0·05% Magnesiumsulfat, 0·2% glycerophosphorsauren Kalk und 1·5% Glycerin enthält und mit Kaliumcarbonat schwach alkalisiert wird.

Bezüglich der ausschließlich zur Züchtung von Tuberkelbacillen hergestellten eiweißfreien Nährlösungen wird auf den Abschnitt Spezialnährböden, Kapitel Tuberkelbacillen, verwiesen.

Die Sterilisation der eiweißfreien Nährlösungen erfolgt in der Weise, daß sie in Reagensgläser abgefüllt und an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 15—25 Minuten im Dampftopf sterilisiert werden.

Auch feste eiweißfreie Nährböden sind angegeben worden, so von *Winogradsky* und von *Sullivan*, die sich hierbei der Kieselsäure bedienen.

C. Spezielle Nährböden.

Unter speziellen Nährböden oder Spezialnährböden sind solche Nährmedien zu verstehen, die für die Isolierung oder Fortzüchtung einer bestimmten Bakterienart besonders geeignet sind, ohne daß damit gesagt sein soll, daß nicht auch andere Bakterien auf ihnen zur Entwicklung kommen. Nährböden, auf denen nur eine bestimmte Bakterienart ausschließlich oder fast ausschließlich gedeiht, nennen wir Elektivnährböden, als deren typische Repräsentanten der *Dieudonné'sche* Blutalkaliagar und die verschiedenen, von diesem Nährboden abgeleiteten Modifikationen anzusprechen sind.

Die Zahl der Elektivnährböden ist gering, die Zahl der Spezialnährböden dagegen außerordentlich groß, da es in der Natur der Sache liegt, daß es leichter gelingt, einen Spezialnährboden für eine Bakterienart zu finden, als einen Elektivnährboden. Unter den Spezialnährböden finden sich zahlreiche, die gleichzeitig auch differentialdiagnostisch verwendbar sind. So beruht ja die Brauchbarkeit fast aller für den Nachweis von Typhus-, Paratyphus-, Ruhrbakterien angegebenen Spezialnährböden darauf, daß das Wachstum der genannten Bakterien in den betreffenden Nährmedien Reaktionen vermissen läßt, die von ihrem Hauptkonkurrenten, dem *B. coli*, ausgelöst werden. Es wird sich daher nicht vermeiden lassen, auf die in diesem Abschnitt angeführten Nährböden in dem Kapitel „Differentialnährböden“ zurückzukommen.

I. Spezialnährböden für Tuberkelbacillen.

a) Nährböden zur Erstzüchtung.

1. Erstarrtes Serum nach *R. Koch* (s. S. 576).
2. Erstarrtes Serum mit Zusatz von Glycerin bis zu 3% nach *Nocard* und *Roux* (s. S. 578).

3. Glycerinkartoffel nach *Pawlowsky*.

Gute Kartoffeln werden unter der Wasserleitung mit der Kartoffelbürste gut gereinigt, dann auf eine halbe Stunde in eine 1%ige Sublimatlösung gelegt, hierauf 12 Stunden in fließendem Wasser belassen. Sodann wird mit einem weiten Korkbohrer ein Zylinder ausgestochen und dieser diagonal mit dem Messer in zwei Keile geteilt. Jeder Keil kommt in ein weites Reagensglas, dessen Boden ungefähr 1 cm³ 4%iges Glycerinwasser enthält. Dann wird möglichst rasch sterilisiert. Eine Alkalisierung ist überflüssig.

4. Glycerinkartoffel nach *Anzilotti*.

Kartoffelkeile werden in einer 6%igen Glycerinlösung, die mit einer gesättigten Lösung von kohlen saurem Natron alkalisch gemacht worden ist, so lange gekocht, bis sie ganz weich und stark aufgequollen sind (ca. 20 Minuten). Verändert sich die Reaktion, so muß diese mit Natronlauge wieder hergestellt werden. Die so präparierten Kartoffeln kommen in *Rouxsche* Gläser über 6%ige Glycerinbouillon. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven bei 120° 20 Minuten.

5. Glycerinkartoffelbouillonagar nach *Jurewitsch*.

500 g geschnittene und zerriebene Kartoffeln werden mit 500 bis 1000 cm³ Wasser versetzt, 1 Tag kalt aufbewahrt, geschüttelt und durch Leinwand gepreßt. Nach $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Stunde wird das Infus vom Bodensatz abgossen. Hiermit wird ein in gewöhnlicher Weise hergestelltes Fleischwasser zu gleichen Teilen gemischt und $\frac{1}{2}$ % Pepton Witte und $\frac{1}{4}$ % Kochsalz zugesetzt. 1 Stunde kochen, alsdann filtrieren. Nach weiterem Zusatz von 3% Glycerin und gesättigter Sodalösung bis zur ausgesprochenen alkalischen Reaktion wird im Autoklaven $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Stunde sterilisiert, filtriert und nochmals sterilisiert.

6. Eiernährböden nach *Dorset* (s. S. 582).

7. Eigelbnährboden nach *Lubenau* (s. S. 582).

8. Eiernährboden nach *Park* und *Krumwiede*.

Das ganze Ei kommt bei diesem Nährboden zur Verwendung. Es wird im Verhältnis 10:100 mit Wasser gemischt und ohne Schaumbildung gerührt, sodann wird das Gemisch durch ein Seihetuch filtriert, in Röhrechen gefüllt und zum Erstarren gebracht (2 Stunden bei 70°).

9. Eiernährboden nach *Petroff*.

2 Teile vom Ganzen eines Eies, 1 Teil Fleischsaft und Gentianaviolett (1%ige alkoholische Lösung) im Verhältnis 1:10.000. Nachdem diese Substrate einige Minuten gut durchgemischt sind, wird das Medium in Röhrechen gebracht und am ersten Tage bei 85° bis zum Festwerden, am zweiten und dritten Tage bei 75° je eine Stunde lang sterilisiert.

10. Eibouillon nach *Besredka* und *Jupille* (s. S. 582).

b) Nährböden zur Weiterzüchtung.

1. Glycerinbouillon (zur Erzielung von Massenkulturen).

1 kg gutes, nicht gekochtes Fleisch wird mit der Fleischhackmaschine gewiegt, mit der doppelten Menge Wasser übergossen und über Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Es ist gleichgültig, was für Fleisch verwendet wird; sogar Placenten eignen sich. Das Fleisch kann auch durch *Liebig's* Fleischextrakt (10 g auf 1 l Wasser) ersetzt werden; allerdings enthält die damit hergestellte Bouillon entwicklungshemmende Stoffe, so daß die Bereitung aus Fleisch vorzuziehen ist. Dann wird das Fleisch mit dem Wasser eine Stunde lang gekocht, gewöhnlich mit 1% Pepton und 0.5% NaCl versetzt und durch ein angefeuchtetes Papierfilter filtriert. Ist die Bouillon klar, so wird jetzt 2.5% Glycerin zugesetzt. Wichtig ist die Reaktion des Nährbodens. Die Tuberkelbacillen gedeihen ausgezeichnet auf Glycerinbouillon, der man die ursprüngliche Reaktion der Fleischabkochung belassen hat. Auch erhält man so Bouillonkochungen von gleichmäßigerer Zusammensetzung, als wenn man die Salze des Fleischwassers durch Zusatz von Alkali zum Teil ausfällt. Um die Nährbouillon der amphoteren Reaktion näher zu bringen, empfiehlt *Ficker* einen Zusatz von 0.5% saurem Kaliumphosphat und *Jochmann* Spuren von Milchsäure. *Nocard* und *Roux* erzielten bei Zusatz von 8% Glycerin gute Resultate, während nach den Erfahrungen *Löwensteins* ein Zusatz über 5% zum mindesten keinen Vorteil bedeutet. Die fertige Glycerinbouillon wird in kleine *Erlenmeyer*-Kolben oder in größere flache Kolben gefüllt.

2. Glycerinbouillon nach *Marmorek*.

0.5 kg Kalbsmilch wird 24 Stunden in 1 l Wasser stehen gelassen, dann 10 Minuten auf offener Flamme gekocht, filtriert, nach Zusatz von 1% Pepton Chapoteau und 0.5% Kochsalz oder besser Monokaliumphosphat wieder filtriert und mit 10%iger Sodalösung ganz schwach alkalisch gemacht, 25 Minuten im Autoklaven gekocht und filtriert. Dieser Nährboden wird dann mit 2—3% Glycerin versetzt, in Kölbchen abgefüllt und nochmals bei ca. 115° im Autoklaven sterilisiert.

3. Glycerinagar.

Auf gewöhnlichem Agar wächst der Tuberkelbacillus nicht oder höchstens ganz kümmerlich; erst der Zusatz von Glycerin ermöglicht sein Wachstum. 2%iger gewöhnlicher Agar — ein höherprozentiger Agar ist nicht zu empfehlen — wird mit Normalnatronlauge bis zu schwach saurer Reaktion auf blauem Lackmuspapier neutralisiert. Der Nährboden muß stets genügend Kondenswasser aufweisen.

4. Glycerinagar nach *Szaboky*.

1 kg zerkleinerte Lunge wird mit 2 l Wasser gekocht, alsdann Zusatz von 10 g Agar, 10 g Kochsalz, 20 g Pepton Witte, 100 g Glycerin und 10 g Traubenzucker, nochmals kochen, neutralisieren und filtrieren.

5. Nährböden nach *Bruschettini*.

100 cm^3 gewöhnliche Kalbfleischbouillon werden mit 10 cm^3 defibriniertem Kaninchen- oder Froeschblut und 5 cm^3 Eidotter gemischt.

6. Glycerolate nach *Cantani*.

Blut, Serum, Milch, Ascites werden mit gleichen Mengen Glycerin versetzt und sind nach 2—3 Monaten steril (s. auch S. 571 u. 579). Diese Mischungen, Glycerolate genannt, werden wie Glycerinserum verwandt.

7. Hirnnährböden nach *Ficker*.

Hirn, so frisch wie möglich, wird zermahlen, mit gleichen Mengen destillierten Wassers versetzt und unter beständigem Umrühren langsam zum Kochen gebracht. Nach $\frac{1}{4}$ Stunde langem Kochen wird die Masse koliert, u. zw. nicht nur, solange flüssige Kolatur abläuft, sondern man drückt kräftig die weiche Hirnmasse durch das Koliertuch hindurch, bis die Gesamtkolatur einen leichtbreiigen Charakter annimmt. Die Kolatur wird auf Kolben gefüllt und 2 Stunden im Dampf sterilisiert. Diese Hirnkolatur wird mit Serum oder Agar in feste Form gebracht: a) Serum mit Gehirn (Hirnkolatur + Serum aa + 3% Glycerin) wird bei geeigneter Temperatur in Reagensgläsern zum Erstarren gebracht; b) Hirnkolatur wird zu 2·5% igem Agar zu gleichen Teilen zugesetzt, dazu 3% Glycerin, sterilisieren. Die Hirnkolatur ist sauer; sie darf nicht neutralisiert werden.

8. Glycerinierte Organe.

Gekochte, mit Glycerin getränkte Leber ist zuerst von *A.* und *L. Lumière* empfohlen worden. *Frugoni* geht in der Weise vor, daß er die Organe — Lunge oder Leber vom Kaninchen oder Hunde — $\frac{1}{12}$ bis $\frac{3}{4}$ Stunden im Autoklaven kocht, damit sie möglichst hart werden, und Prismen ausschneidet, die er 1—2 Stunden in 6—8% igem Glycerinwasser liegen läßt. Die Organstücke kommen alsdann in Röhrchen, in denen sich Glycerinbouillon und ein Glasstäbchen befinden, so daß sie die Flüssigkeit gerade berühren; die Röhrchen werden mittels Gummistopfen verschlossen.

9. Glycerinmilch nach *Griffith*.

An Stelle des Fleischwassers wird entrahmte Milch benutzt, der 2% Glycerin zugefügt werden.

10. Heydenagar nach *Hesse*.

Nährstoff Heyden 5 g, Kochsalz 5 g, Glycerin 30 g, Agar 10 g. Normallösung von Krystallsoda (28·6 : 100) 5 cm^3 , Aqua dest. 1000. Man nimmt ein Becherglas, gibt ein wenig Wasser hinzu, schüttet den Nährstoff Heyden hinein, bis der Nährstoff durchaus benetzt ist, und quirlt dann so lange, bis der Nährstoff vollkommen gelöst ist. Hierauf wird die Lösung dem Agar, der zuvor mit den oben angegebenen Mengen von Kochsalz, Glycerin und Soda in Aqua dest. etwa 2 Stunden gekocht wurde, zugefügt und das Gemisch noch etwa $\frac{1}{4}$ Stunde lang unter beständigem Umrühren vorsichtig weiter gekocht. Filtration.

11. Bohnenwassernährboden nach *Löwenstein*.

Statt des Fleischwassers eignet sich Bohnenwasser als ein ausgezeichneter Nährboden, der mindestens ein solches Erträgnis liefert wie das Fleischwasser: Auf 1 *kg* weiße Bohnen, sog. Saubohnen, werden 10 *l* destilliertes Wasser gegossen, 24 Stunden stehen gelassen, dann wird unter sorgfältigem Umrühren auf offener Flamme gekocht, hierauf werden die Bohnen abkoliert. Das gelblich getrübbte Wasser wird mit 0·5% Pepton, 0·5% Kochsalz und 4% Glycerin versetzt. Ist die Flüssigkeit noch nicht klar, so muß die Filtration wiederholt oder durch Zusatz von Serum oder Eiereiweiß Klärung erzielt werden. Sterilisation im Dampftopf und Abfüllen auf Röhrchen.

c) Albumosefreie Nährböden.

1. Nährflüssigkeit nach *Kühne*.

Sie besteht aus dem „Aschenersatz“ — Ersatz für die von *Kühne* zuerst angewandte Asche des *Liebigschen* Fleischextrakts — und der eigentlichen Nährflüssigkeit. Der „Aschenersatz“ wird folgendermaßen hergestellt:

Kochsalz	16·0
Krystallisiertes Magnesiumsulfat . . .	3·4
Gebrannter Gips	1·5
Gebrannte Magnesia	2·5
Trockene Pottasche	62·13
Soda	7·35
Ferrum reduct.	6·20
Phosphorsäure von 1·3 spez. Gew. . .	95·00
Milchsäure von 1·2 spez. Gew.	50—60·00
Wasser	600

Das Ganze wird aufgeköcht. 12 *cm*³ dieser Flüssigkeit entsprechen ungefähr 10 *g* des käuflichen *Liebigschen* Fleischextraktes und werden 1 *l* Nährflüssigkeit zugesetzt, die folgende Zusammensetzung besitzt:

Leucin	4·0
Tyrosin	1·0
Asparagin	2·0
schleimsaures Ammoniak	2·0
Leucin	0·5
Glycerin	40·0
Kochsalz	5·0
Wasser	1000·0

2. Nährflüssigkeit nach *Proskauer* und *Beck*.

Sie ist wesentlich einfacher zusammengesetzt und enthält den Stickstoff nur in Form des kohlensauren Ammons:

Käufliches Ammoniumcarbonat . . .	0·35%
Monokaliumphosphat	0·13 „
Magnesiumsulfat	0·25 „
Glycerin	1·5 „

3. Nährflüssigkeit nach *Löwenstein*:

Ammoniumphosphat	6 %
Glycerin	40 „
Wasser	1000·0

Das Wachstum der Tuberkelbacillen auf dieser überaus einfach zusammengesetzten Nährlösung erfolgt nicht mehr so üppig wie auf den gewöhnlichen Nährböden.

4. Nährflüssigkeit nach *Lockemann*:

Monokaliumphosphat	0·4 %
Mononatriumphosphat	0·3 „
Magnesiumsulfat	0·06 „
Magnesiumcitrat	0·25 „
Asparagin	0·5 „
Glycerin	2·0 „

Diese Nährlösung unterscheidet sich von der von *Proskauer* und *Beck* angegebenen hauptsächlich dadurch, daß statt Soda Mononatriumphosphat zugesetzt wird.

II. Spezialnährböden für Diphtheriebacillen.

1. *Loeffler*-Serum (s. S. 578) ist der klassische Nährboden für Diphtheriebacillen, der von keinem der nachstehend aufgeführten Nährböden übertroffen wird.

Zur Ersparung von Blutserum empfiehlt *H. Langer* in die Petrischalen erst ca. 10 cm³ 2%ige Agarlösung mit einem Gehalt von 0·5% Kochsalz, aber ohne Fleischwasser und Pepton zu geben und nach dem Festwerden des Agars etwa 5 cm³ des *Loeffler*-Serumgemisches aufzugießen. Hierauf werden die Platten im Serumofen bis zu 90° erhitzt, wobei das Serum erstarrt, während der darunter befindliche Agar flüssig wird. Die Platten müssen daher vorsichtig aus dem Ofen genommen werden, oder noch besser in ihm erkalten. Der erstarrte Nährboden soll fester und elastischer sein als das *Loeffler*-Serum ohne Agarunterlage.

2. Serumgalleplatte nach *v. Drigalski* und *Bierast*.

600 cm³ Rinderserum werden mit 174 cm³ Traubenzuckerbouillon und 26 cm³ Galle gemischt und in Platten ausgegossen. Erstarrt werden die Platten im Serumerstarrungsapparat in derselben Weise wie bei *Loeffler*.

3. Tellurplatte nach *Conradi* und *Troch*.

Zu 1000 cm³ Wasser fügt man 10 g Fleischextrakt, 5 g Kochsalz, 20 g Pepton Witte und 6 g Calcium bimalicum. Das Gemenge wird $\frac{1}{2}$ Stunde im kochenden Dampftopf gehalten, dann wird filtriert. Dem schwach sauer reagierenden Filtrat wird Traubenzucker zugesetzt, und zwar 1 g auf 100 cm³ Flüssigkeit. Von letzterer wird alsdann 1 Teil zu 3 Teilen ganz frischen Rinderserums gegeben. Zu 100 cm³ dieses fertigen

Gemisches fügt man 2 cm^3 einer 1%igen Lösung von Kalium tellurosum hinzu. Schließlich wird die gemischte schaumlose Flüssigkeit auf Petrischalen verteilt, deren Glasdeckel innen mit saugfähigem Papier belegt ist. Dann läßt man das Serum auf einer eigens konstruierten, auf 85° eingestellten Erstarrungsplatte fest gerinnen, indem die Petrischalen oben darauf eine Viertelstunde lang verweilen.

Diese kurze Sterilisation kann, zumal im Sommer, öfters erfolgen. Auf der Tellurplatte, die nur die *Loeffler*-Platte ergänzen soll, wachsen die Diphtheriebacillen in schwarzen Kolonien, was auf Reduktion des Tellurs durch die Diphtheriebacillen beruht.

4. Serumlackmusplatte nach *Costa*, *Troisier* und *Dauvergne*.

100 cm^3 Pferdeserum werden mit 10 cm^3 30%iger Traubenzuckerlösung, 30 Tropfen steriler Lackmuslösung, 3·0 cm^3 1%iger Schwefelsäurelösung gemischt und in Platten gegossen. Erstarren wie bei *Loeffler*. Diphtheriebacillen wachsen mit rotem Zentrum und blaßrotem Rande, Pseudodiphtheriebacillen als grauweiße Kolonien.

5. Serumagar nach *Tochtermann* (s. S. 578).

6. Alkalialbuminatagar mit Serum nach *A. Joos*.

300 cm^3 Blutserum, 50 cm^3 Normalnatronlösung und 150 cm^3 destilliertes Wasser werden in einem Kolben mit flachem Boden gemischt und 2—3 Stunden lang im Wasserbad von 60—70°, sodann 30—45 Minuten im Dampftopf erhitzt. Hierauf Zusatz von 500 cm^3 alkalischer Bouillon mit 2% Pepton und 1½% Kochsalz. In dem Gemisch läßt man 20 g Agar so rasch als möglich auflösen. Nach der Lösung wird filtriert und ¼ Stunde bei 100—110° im Autoklaven sterilisiert. Sodann werden Platten gegossen.

7. Alkalialbuminatagar mit Serum nach *Karl Klein*.

9 Teile Serum werden mit 1 Teil offizineller Natronlauge 2 Tage lang bei 37° gehalten, das Gemisch wird mit Salzsäure neutralisiert; hiervon wird 1 Teil mit 4 oder 5 Teilen Nähragar versetzt und bei 105° eine halbe Stunde lang erhitzt. Der Nährboden ist sicher sterilisierbar, durchsichtig, haltbar, gießbar und sparsam im Serumverbrauch.

8. Alkalialbuminatnährboden mit Fleisch nach *Deuycke* in der Modifikation von *Bosse*.

250 g frisches, von Sehnen und Fett befreites Pferdeherz werden zerkleinert, hiervon wiegt man 125 g ab und setzt 3 g frischestes Pepsin Witte (nicht Pepton), 400 cm^3 destilliertes Wasser und 2 cm^3 50%ige Salzsäure hinzu. Das Ganze läßt man in Erlenmeyerkolben bei 37° im Brutschrank während 2 Tagen künstlich verdauen, schüttelt mehrmals um, kontrolliert die Reaktion und setzt allenfalls Salzsäure zu. Hierauf wird filtriert, was wegen des Geruchs möglichst über Nacht geschehen muß. Mit einer Probe des Filtrats wird die Biuretreaktion vorgenommen, die unter allen Umständen mit Kalilauge und verdünntem Kupfersulfat

positiv ausfallen muß (Violettanfärbung). Hierauf wird das Filtrat mit 3·9 g Natrium carbonicum siccum versetzt und sterilisiert.

Herstellung einer Trypsinlösung. Fein zerschnittenes Schweinepankreas wird nach 24stündigem Aufenthalt im Eisschrank mit 40 cm³ reinem Glycerin und 160 cm³ destilliertem Wasser versetzt und bleibt einige Tage im Eisschrank stehen. Der ausgepreßte Saft hält sich im Eisschrank nach Zusatz eines Stückchen Camphers. Von diesem Pankreasauszug werden 15 cm³ obigem Filtrat zugesetzt. Das Gemisch bleibt sodann genau 6 Stunden im Brutschrank bei 37° und wird nach der Herausnahme sofort im Dampf sterilisiert und mit 5%iger Salzsäure neutralisiert. Weiterer Zusatz von 1950 g Wasser, 6 g Kochsalz und 39 g Agar. Die Masse wird 3 Stunden gekocht, im Dampftopf durch Watte filtriert, in Kölbchen gefüllt und sterilisiert. Zum Gebrauch werden hiervon Platten gegossen.

9. Ascitesblutglycerolat nach *Cantani* (s. S. 579).

10. Glycerinblutagar nach *Mandelbaum* und *Heinemann*. (Näheres s. „Differentialnährböden“.)

11. Eiernährböden nach *Lubenau* (s. S. 582).

12. Rhodankaliumnährboden nach *Rankin*.

5 Teile Blutserum vom Schaf, 1 Teil Bouillon, dazu 0·5% Glucose, 1% Rhodankalium und 2% einer wässerigen 0·5%igen Neutralrotlösung. Bei Anwesenheit von Diphtheriebacillen soll Rotfärbung auftreten.

III. Spezialnährböden für Typhusbacillen (Paratyphus- und Ruhrbacillen).

Die beiden erstgenannten Gelatinenährböden kommen zwar für den Nachweis von Typhusbacillen nicht mehr in Frage, haben aber historisches Interesse und verdienen infolgedessen unsere Beachtung:

1. Kartoffelgelatine nach *Holz*.

Sauber geschälte und gewaschene Kartoffeln werden zerrieben, der abstehende Saft und Kartoffelbrei gesammelt, auf ein Tuch gebracht und ausgepreßt. Nach 24stündigem Stehen bei niedriger Temperatur wird der inzwischen braun gewordene Saft filtriert, das Filtrat im Dampftopf $\frac{1}{2}$ Stunde erhitzt und dann nochmals filtriert. Das Filtrat erhält einen Zusatz von 10% Gelatine, wird nochmals $\frac{3}{4}$ Stunden im Dampftopf erhitzt und dann filtriert. Der so gewonnene Nährboden reagiert sauer; 10 cm³ desselben erfordern 1·6—3·2 cm³ $\frac{n}{10}$ -Alkali zur Neutralisierung. Die *Holz*sche Kartoffelgelatine hat eine dunklere Farbe als die gewöhnliche Nährgelatine; die dunklere Färbung beruht auf dem Eisengehalt des Nährbodens (*Günther*). *Elsner* suchte die Kartoffelgelatine durch Zusatz von 1% Jodkalium zu verbessern.

2. Harn gelatine nach *Piorkowski*.

Der Nährboden besteht aus alkalisch gewordenem Harn, dessen spezifisches Gewicht am besten 1020 betragen soll, mit einem Zusatz von 0·5% Pepton und 3·5% Gelatine.

Dieser Gelatinenährboden läßt die Typhusbacillen in recht charakteristischer Weise auskeimen. In dicht besäten Platten bilden sich Kolonien mit kleinem, hellem, länglichem Keim. Von diesem gehen, meist von den Polen, je 4—6 faserförmige, ranken- oder spirillenartig gewundene Ausläufer aus, deren Länge den Kern um das Fünffache übertreffen kann. Das typische *B. coli* bildet dagegen runde, gelbliche Kolonien mit scharfem Rande ohne Ausläufer. Es bestehen zwischen diesen typischen Typhus- und Kolikolonien alle möglichen Übergänge.

Die folgenden Nährböden haben zumeist das gleiche Grundprinzip: es wird die Fähigkeit des *B. coli*, verschiedene Kohlenhydrate zu zerlegen, die der *B. typhi* unverändert läßt, unter Zusatz eines geeigneten Indicators ausgenutzt, so daß das Aufsuchen der Typhusbacillen durch den zwischen ihnen und den Kolibakterien bestehenden Farbumterschied erleichtert wird. Durch geeignete Zusätze wird versucht, die Begleitbakterien, insbesondere das *B. coli*, in ihrem Wachstum zu hemmen, ohne daß dadurch das Wachstum der Typhusbacillen nachteilig beeinflusst wird. Indes ist es bisher noch nicht gelungen, einen in dieser Richtung restlos befriedigenden Elektivnährboden zu finden; immerhin sind die mit den folgenden Nährböden zu erzielenden Resultate recht beachtenswert.

3. Lackmusmilchzucker-Agar nach *v. Drigalski* zum Nachweis von Ruhrbacillen.

1 l gewöhnlicher, schwach alkalischer 2%iger Fleischwasserpeptonagar wird verflüssigt; Lackmuslösung (*Kubel-Tiemann*) 130·0 g, 10 Minuten kochen, dazu 15 g Milchzucker, 15 Minuten zusammen kochen. Die heiße Lackmusmilchzuckerlösung wird zu dem flüssigen Agar gegeben. Die ursprüngliche schwach alkalische Reaktion, welche durch Säurebildung aus dem kochenden Milchzucker meist verloren geht, wird wieder hergestellt. Alsdann zusetzen 4 cm³ einer warmen Lösung von 10% Soda cryst. („wasserfrei“) in Aqua dest., gut mischen. Platten gießen oder den Vorrat in sterile Kölbchen zu je 200 cm³ abfüllen. Unnötiges Kochen ist zu vermeiden, weil Milchzucker dabei zersetzt wird.

4. Lackmusnutroseagar nach *v. Drigalski* und *Conradi* zum Nachweis von Typhus-, Paratyphus- und Ruhrbacillen.

a) 1500 g zerkleinertes Rindfleisch 12—24 Stunden mit 2000 cm³ Wasser stehen lassen. Das abgepreßte Fleischwasser 1 Stunde kochen; filtrieren; versetzen mit 20 g Pepton, 20 g Nutrose (oder auch Tropon), 10 g Kochsalz; 1 Stunde kochen; filtrieren; zusetzen 60 g Agar; drei Stunden kochen; schwach alkalisieren (Indicator: Lackmuspapier); filtrieren, 1½ Stunde kochen.

b) 260 cm^3 Lackmuslösung nach *Kubel* und *Tiemann* (von der Firma C. A. F. Kahlbaum in Berlin SO., Schlesische Straße 35) 10 Minuten kochen; 30 g chemisch reinen Milchezucker zusetzen; 15 Minuten (nicht länger! [behufs Vermeidung von Zersetzung des Milchezuckers]) kochen.

c) Die heiße Lackmusalzuckerlösung (b) zusetzen zu der heißen Agarlösung (a); umschütteln; die etwa verschwundene schwach alkalische Reaktion wiederherstellen; 4 cm^3 heiße, sterile, 10%ige Lösung von wasserfreier Soda zusetzen; ferner Zusatz von 20 cm^3 einer jedesmal frisch zu bereitlebenden Lösung von 0.1 g Krystallviolett B (zu beziehen von den Farbwerken vorm. Meister Lucius und Brüning in Höchst a. M.) in 100 cm^3 warmem destillierten Wasser.

Der Nährboden wird in kleinen Mengen zu 200 cm^3 auf Kölbchen abgefüllt.

Das Prinzip des *Drigalski-Conradi*-Agars ist das gleiche wie bei dem von *Wurtz* angegebenen Agar (s. „Differentialnährböden“): das *B. coli* zersetzt Milchezucker unter Säurebildung, während der *Typhusbacillus* dies nicht tut. Infolgedessen wachsen die Kolibakterien rot, während die *Typhusbacillen* in der Farbe des Nährbodens, also blau, wachsen. Die Vorzüge gegenüber dem *Wurtz*schen Agar bestehen darin, daß durch die stärker gewählte Agarkonzentration ein Diffundieren des roten Farbstoffes von der Kolonie des *B. coli* aus möglichst verhindert wird, welchem Zwecke auch gleichzeitig der Sodazusatz dient, und daß durch den Krystallviolettzusatz ein Teil der Begleitbakterien, insbesondere säurebildende Kokkenarten, die im Stuhle häufig in großer Menge vorkommen, in ihrem Wachstum unterdrückt werden. Allerdings entspricht nach neueren Untersuchungen v. *Drigalskis* (persönliche Mitteilung) das ungefähr seit dem Jahre 1916 erhältliche Krystallviolett nicht mehr diesen Anforderungen, so daß unter Umständen das Krystallviolett nicht nur nichts nützt, sondern sogar schädlich ist, indem es auch das Wachstum von *Typhusbacillen* hemmt.

Gleiches Wachstum wie *Typhusbacillen* weist eine ganze Reihe von im Darm vorkommenden, teils pathogenen teils saprophytischen Bakterien auf. Zu den pathogenen Bakterien dieser Art gehören die Vertreter der Paratyphusgruppe (*Paratyphus* A, *Paratyphus* B, *Enteritidis* Gärtner), der Ruhrgruppe und *Cholera*vibrionen.

5. Entfärbter Fuchsinagar nach *Marpmann*.

1 g Fuchsin wird in 100 Teilen Wasser gelöst, mit konzentrierter Natriumbisulfatlösung entfärbt und die farblose Lösung zu 2 Teilen gewöhnlichen Agar- oder Gelatinelösungen zugesetzt und sterilisiert.

In derselben Weise wurde von dem gleichen Autor ein Malachitgrünagar hergestellt.

6. Fuchsinagar nach *Endo* zum Nachweis von Typhus-, Paratyphus- und Ruhrbacillen.

Er ist als eine elegante Modifikation des *Drigalski*-Agars bzw. -Verfahrens anzusehen und wird in folgender Weise hergestellt:

Man setzt zu 500 g zerhacktem Rindfleisch 1 l Wasser, 10 g Pepton, 5 g Kochsalz und 30 g Agar, kocht gut, filtriert, neutralisiert und fügt nochmals 10 cm³ einer 10%igen Sodalösung hinzu, um zu alkalisieren. Dann kommen Milchzucker und Fuchsinlösung hinzu, wodurch der Nährboden rot gefärbt wird; darnach wird Natriumsulfitlösung zugesetzt, wodurch sich der Nährboden allmählich entfärbt, aber erst dann ganz farblos wird, wenn der Agar erstarrt ist. Nachdem der Nährboden in Reagensgläser (je 15 cm³) gefüllt worden ist, wird er ca. 30 Minuten lang im Dampfapparat sterilisiert.

Zu bemerken ist dabei:

1. Der Milchzucker muß chemisch rein sein, denn der käufliche Milchzucker enthält gewöhnlich Rohrzucker und mit diesem Rohrzucker bilden die Typhusbacillen Säure, infolgedessen wird es sehr schwer, sie von den Kolibakterien zu unterscheiden.
2. Die Natriumsulfitlösung muß entweder in einer gut zugeschlossenen Flasche aufbewahrt oder zum Gebrauche frisch zubereitet werden.
3. Die alkoholische Fuchsinlösung muß vorher filtriert werden.
4. Der Nährboden muß im Dunkeln aufbewahrt werden, sonst nimmt er beim Lichtzutritt allmählich eine rote Färbung an.

Beim Gebrauche wird der Nährboden verflüssigt, in sterilisierte Petrischalen gegossen und eine Zeitlang (15 Minuten und darüber) an staubfreien Orten offen stehen gelassen, bis er erstarrt.

Die Platten werden nach dem Erkalten ganz farblos und durchsichtig.

Auf dem Endoagar werden Kolikolonien schon nach 15 Stunden vom Zentrum aus allmählich rot, nach 24 Stunden ganz schön rot. Die Kolonien sind rund und am Rande hervorragend. Die Typhusbacillen bilden dagegen runde, farblose, am Rande dünne Kolonien.

Was nun den Chemismus des Farbumschlages des Nährbodens anbelangt, so kann man folgendes annehmen: Fuchsin besteht im wesentlichen aus salzsaurem Rosanilin $C_{20}H_{19}N_3HCl$. Rosanilin ist eine farblose sog. Leukobase, die mit verschiedenen Säuren, wie Milchsäure, Salzsäure u. s. w. einen roten Farbstoff bildet. Die Säurekomponente des roten Rosanilinsalzes wird durch Reduktionsmittel wie Natriumsulfit leicht reduziert. Das dadurch entfärbte Rosanilin verbindet sich mit der durch Kolibakterien produzierten Säure, infolgedessen färbt sich der Nährboden schon rot.

Nach *Aronson* wird nicht die Säurekomponente des Fuchsin durch das Natriumsulfit reduziert und dann der Farbstoff durch die bei der Zersetzung des Milchzuckers entstehende Milchsäure wiederhergestellt, sondern es bildet sich vielmehr die farblose fuchsin-schweflige Säure, welche durch das bei der Spaltung des Zuckers sich bildende Aldehyd in einen roten Farbstoff übergeführt wird.

Gaetgens modifizierte den *Endo*-Agar, indem er 0.33 % chemisch reines Coffein hinzufügte. *B. coli* wird in seinem Wachstum gehemmt, ohne daß Typhusbacillen geschädigt werden.

Endo-Agar wird von den gleichen Bakterienarten unverändert gelassen, die auf Drigalski-Conradi-Agar eine Farbänderung nicht bewirken.

7. Malachitgrünagar nach *Lentz* und *Tietz*.

a) Originalvorschrift für die Herstellung.

3 Pfund fettfreies Rindfleisch werden fein gehackt und mit 2 l Wasser während 16 Stunden maceriert, das Fleischwasser wird dann abgepreßt. $\frac{1}{2}$ Stunde gekocht, filtriert; darauf werden 3 % Agar hinzugefügt und 3 Stunden gekocht; dann werden zu dem Agar 1 % Pepton, 0.5 % Kochsalz und 1 % Nutrose (dies kann auch fehlen), in $\frac{1}{4}$ l kalten Wassers unter leichtem Anwärmen gelöst, hinzugefügt, bis zum Lackmusneutralpunkt gegen Duplittestpapier mit Sodalösung alkalisiert, 1 Stunde gekocht und durch Leinwand filtriert. Der nun fertige Agar reagiert wieder deutlich sauer; er wird jetzt auf kleine, 200—300 cm³ haltende Kolben gefüllt, die, wenn sie aufbewahrt werden sollen, in gewöhnlicher Weise dreimal sterilisiert werden.

Vor dem Zusatz des Malachitgrüns wird der heiße Agar gegen Duplittestpapier geprüft und so weit mit steriler Sodalösung alkalisiert, daß der violette Streifen nach oben rot gefärbt wird, während der rote Streifen schon deutlich rotviolett erscheint. (Dieser Reaktionspunkt entspricht bei Agar ohne Nutrose einem Alkaleszenzgrade von 1.8 % Normalnatronlauge unter dem Phenolphthaleinneutralpunkte; enthält der Agar dagegen Nutrose, die Lackmus und den Bakterien gegenüber sich neutral verhält, so entspricht die Reaktion einem Alkaleszenzgrade von 35 % Normalnatronlauge unter dem Phenolphthaleinpunkte.)

Auf 100 cm³ dieses heißen Agars wird alsdann 1 cm³ einer Lösung des Malachitgrüns (Malachitgrün I, Höchst) 1:60 Aqua dest. Die Lösung hält sich, gut verkorkt, 10 Tage im Zimmer unverändert — hinzugefügt, so daß der Agar den Farbstoff in der Konzentration 1:6000 enthält. Der nun fertige Agar wird sofort in Petrischalen in 2 mm dicker Schicht ausgegossen. Die Schalen werden gut getrocknet und können tagelang im Eisschrank aufbewahrt werden.

Wachstum von Typhusbacillen und *Bacterium coli*. Bei der genannten Konzentration des Malachitgrüns in dem Nährboden von *Lentz* und *Tietz* wird das Wachstum der gewöhnlichen Arten des *Bacterium coli* sowie einer ganzen Reihe von Alkalibildnern stark gehemmt bzw. ganz verhindert; auch der Typhusbacillus wird in seiner Entwicklung gehemmt, doch nur so weit, daß nach 24 Stunden bereits mit bloßem Auge erkennbare kleine, sandkorngroße, helle Kolonien vorhanden sind, während bei längerem Aufenthalt im Brutschrank in 2—4 Tagen sich große, kräftige, den Agar gelb färbende Kolonien ausbilden.

b) Vorschrift nach Schindler.

Fettfreies Rindfleisch wird, möglichst klein gehackt, während 20 Sekunden maceriert; dann wird in gewöhnlicher Weise ein 3%iger Nähragar hergestellt. Der fertige Agar muß bei Prüfung mit Lackmuspapier neutral oder schwach sauer reagieren. Die Reaktion ist mit 10%iger Sodalösung einzustellen. Reagiert der Agar schon an und für sich neutral, so wird trotzdem eine geringe Menge Soda, u. zw. 0.3 cm^3 einer 10%igen Lösung auf den Liter Agar zugesetzt. Der fertige Agar wird in Kölbchen von je 100, 200, 500 cm^3 — je nach Bedarf — abgefüllt, um ein wiederholtes Kochen, das unter Umständen die Reaktion beeinflußt, zu vermeiden. Eines dieser Kölbchen wird verflüssigt und zur Bestimmung der günstigsten Malachitgrünkonzentration benutzt. Zu diesem Zwecke werden je 20 cm^3 mit dem Farbstoff in verschiedenen Verdünnungen versetzt. Als Ausgangspunkt dienen wässrige Stammlösungen des Malachitgrüns (Malachitgrünkrystalle extra Höchst), von denen man zweckmäßig mehrere Verdünnungen (1 : 300, 1 : 350 u. s. w.) vorrätig hält. Diese Lösungen werden in der Menge von 1% dem Agar zugesetzt. Nachdem der Grünagar in Schalen ausgegossen ist, wird die eine Hälfte der Platte mit Typhus, die andere mit Koli beimpft. Nach 24 Stunden wird das Resultat abgelesen und so die Malachitgrünmenge, die bei ausreichendem Typhuswachstum die Koli keime völlig oder fast völlig zurückgehalten hat, bestimmt. Diese Menge wird dann jedesmal dem Agar vor Gebrauch zugesetzt. Wird ein neuer Agar hergestellt, so wird in derselben Weise verfahren.

8. Malachitgrünnährböden nach Knorre.

Auf die übliche Weise hergestellter Nähragar wird möglichst genau mit Soda neutralisiert, wobei man geflissentlich besonders einen Fehler nach der sauren Seite hin vermeiden muß. Zu 100 cm^3 des Agars gibt man nach dem Einstellen des Phenolphthaleinneutralpunktes noch $1\text{—}1.5\text{ cm}^3$ einer Normalsodalösung hinzu. Nach der Neutralisation wird der Agar in Portionen zu 200 cm^3 abgeteilt und sterilisiert. Hiervon werden 200 cm^3 wieder flüssig gemacht; in 10 Petrischalen werden 10 Mengen einer 0.2%igen Malachitgrünlösung gebracht, welche eine arithmetische Reihe bilden mit dem Anfangsglied 0.05 cm^3 und mit einem ebenso großen Differenzglied, dann gießt man in jede dieser Schalen 20 cm^3 des flüssig gemachten und unter 80° abgekühlten Agars und mischt dabei gut den letzteren mit dem Malachitgrün. Die getrockneten Platten werden dann mit einem Typhusstamm und mehreren Kolistämmen getrennt beimpft. Nach 20stündiger Bebrütung wird leicht die Platte mit der optimalen Zusammensetzung gefunden.

9. Malachitgrünagar nach Loeffler.

Zu 5 l Bouillon (aus Rind- oder Pferdefleisch, 1 Pfund auf 2 l Wasser) werden 150 g feinsten Stangenagars hinzugegeben und eine

halbe Stunde gekocht. Löst sich der Agar schlecht, so werden 35 cm^3 Normalsalzsäure hinzugefügt, die nach dem Auflösen des Agars sofort durch 35 cm^3 Normalkalilauge neutralisiert werden. Darauf wird mit Natriumcarbonat für Lackmus neutralisiert. Nach dem Neutralisieren wird ein Zusatz von 25 cm^3 einer Normalsodalösung gemacht und nunmehr die schwach alkalische Flüssigkeit aufgeköcht. Zu der kochend-heißen Masse werden 500 cm^3 einer 10%igen wässerigen Nutroselösung hinzugefügt. Nach nochmaligem Aufkochen wird die heiße Lösung in Halbliterflaschen gegossen und je 2 Stunden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf gekocht. Es bildet sich in den Flaschen ein ziemlich fester Bodensatz, von dem der klare, darüberstehende Nähragar abgegossen wird. Zu 100 cm^3 des flüssig gemachten, klaren Bouillonnutroseagars werden, nachdem er bis auf 50° abgekühlt ist, vor dem Gebrauch 1.5 cm^3 einer 0.2%igen Lösung des Malachitgrüns* krystall. chemisch rein hinzugegeben. Der Grünagar wird in Petrischalen gegossen, die offen stehen bleiben, bis der Agar erstarrt und abgekühlt ist.

10. Malachitgrünagar nach Leuchs.

Die Herstellung dieses Malachitgrünagars, die sich im allgemeinen an die Vorschrift *Loefflers* hält, geschieht in folgender Weise: In 100 cm^3 Bouillon (1 Pfund Rindfleisch auf 2 l Wasser) werden 0.5 g Kochsalz, 1 g chemisch reines Dextrin und 3 g Agar gelöst; der Dextrinbouillonagar wird für Lackmus neutralisiert. Hierzu werden weiter 0.5 cm^3 Normalsodalösung und 10 cm^3 einer 10%igen Nutroselösung zugesetzt, das Ganze nochmals aufgeköcht, filtriert, sterilisiert und zum Schlusse mit $1.6\text{--}1.8\text{ cm}^3$ einer 0.1%igen Lösung chemisch reinen Malachitgrüns (Malachitgrünkrystalle extra Höchst) versetzt. Wachstum von Typhus und Paratyphus ist das gleiche wie auf dem *Loefflerschen* Malachitgrünagar.

11. Malachitgrüngelatine nach Loeffler.

4 Pfund reinen, gehackten Rindfleisches werden mit 5 l Leitungswasser in einem Kochtopf angesetzt; sofort werden dazu gegeben 15% = 750 g Gelatine, 1% = 50 g Peptonum siccum Witte und 0.5% = 5 g Kochsalz. Das Ganze wird langsam erwärmt bis zur vollständigen Lösung der Nährgelatine und alsdann $\frac{3}{4}$ Stunden gekocht. Die heiße Masse wird mit kohlensaurem Natron für Lackmus neutralisiert, alsdann wird nochmals aufgeköcht und filtriert. Man erhält dann stets eine klare, goldgelbe Nährgelatine. Zu je 100 cm^3 dieser Nährgelatine werden hinzugefügt 3 cm^3 einer doppelt normalen Phosphorsäure und 2 cm^3 einer 2%igen Malachitgrünlösung (Malachitgrün Nr. 120).

* In der Veröffentlichung von 1906: $2\text{--}2\frac{1}{2}\text{ cm}^3$ einer 2%igen mit sterilisiertem Wasser hergestellten, aber nicht gekochten Malachitgrünlösung (Malachitgrün 120).

12. Säurefuchsin-Malachitgrünagar nach E. und A. Kindborg.

Man hält sich am besten neutralen 3%igen Fleischwasseragar in kleinen Portionen zu etwa 200 cm³ abgefüllt vorrätig. Zum Gebrauch erhitzt man eine oder mehrere derselben und überzeugt sich, daß die Reaktion noch neutral ist, alkalisiert zweckmäßigerweise erst jetzt, weil vorher die alkalische Reaktion beim Sterilisieren Einbuße erleidet. Eine etwaige geringe Trübung des Mediums hat nichts zu bedeuten. Der geeignetste Alkaleszenzgrad wird durch Zusatz von 0.75% Normalnatronlauge nach Einstellung auf Lackmusneutralität erreicht. Alsdann setze man zu dem verflüssigten Agar 5% Milhzucker und erhitze so lange im Wasserbade, bis dieser vollständig gelöst ist. Zum Schluß setze man das Säurefuchsin Grüber-Leipzig (5 cm³ einer gesättigten wässrigen Lösung zu 100 cm³ Agar) und das Malachitgrün Ia Höchst (4 cm³ einer Normallösung von 1:120) hinzu und gieße in Drigalski-Schalen. Diese kommen nach dem Erstarren auf mindestens 24 Stunden in den Brutschrank, wo sich das Kondenswasser verliert.

Typhus- und Paratyphuskolonien entfärben den Nährboden.

Modifikation von Weißkopf. Dieser Autor gab dem Nährboden statt der schwach alkalischen Reaktion eine genau lackmusneutrale und wandte gleichzeitig das Säurefuchsin weniger konzentriert an. Infolgedessen tritt die Entfärbung des Nährbodens durch Typhus und Paratyphus wesentlich schneller ein.

E. Kindborgs Modifikation des Säurefuchsin-Malachitgrün-Agars.

Zur Verwendung gelangte Säurefuchsin S der Firma J. D. Riedel-Berlin und ein Malachitgrün der Pharmazeutischen Handelsgesellschaft in Stettin, das nicht nur Typhusbacillen, sondern auch die Ruhrerreger und selbst Choleravibrionen ungeteilt wachsen läßt.

Die Herstellung des Säurefuchsin-Malachitgrün-Agars in seiner jetzigen Gestalt geschieht folgendermaßen:

Man hält sich eine 3%ige Stammlösung des Säurefuchsin und eine Malachitgrünlösung 1:10.000 (hergestellt aus einer Grundlösung von 0.1:100) vorrätig. Dann gibt man zu 1 l genau lackmusneutralen Agars, den man durch Absetzenlassen etwas geklärt hat, 50 cm³ der roten und 10 cm³ der grünen Flüssigkeit, außerdem 14 g in etwa 40 cm³ Wasser gelösten Milhzuckers und sterilisiert vor dem Plattengießen 1/2 Stunde im Dampftopf.

Der Nährboden ist gegen Licht unempfindlich und für die Typhus- und Ruhrdiagnose in gleicher Weise brauchbar.

13. Malachitgrün-Reinblau-Safraninagar nach Loeffler.

2 1/2 Pfund Rindfleisch werden zerkleinert, mit 5 l Wasser angesetzt und etwa eine Stunde in einem Aluminiumkessel gekocht. Alsdann wird filtriert und das Filtrat auf 5 l aufgefüllt. Diese 5 l Bouillon werden mit 150 g (3%) feinsten Stangenagars versetzt und bis zur Lösung des

Agars gekocht. Darauf wird neutralisiert mit gesättigter Natriumcarbonatlösung unter Tüpfeln auf empfindlichem Lackmuspapier. Es wird so lange von der Natriumcarbonatlösung hinzugesetzt, bis blaues Lackmuspapier dunkelvioletts erscheint. Rotes Lackmuspapier wird dann schwach gebläut. Darauf werden noch 25 cm^3 Normalsodalösung hinzugegeben. Nach dem Neutralisieren wird nochmals aufgeköcht. Zu der heißen Flüssigkeit werden 50 g Nutrose, die in 500 cm^3 etwa 70° warmen Wassers langsam eingequirlt wurden, hinzugesetzt. Die Gesamtmasse wird in dem Aluminiumtopf nochmals durchgekocht und alsdann in Halbeliterflaschen aus Jenenser Glas eingefüllt. In den Flaschen wird der Agar an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je zwei Stunden im Dampfstrom gekocht, nach dem Flüssigwerden jedesmal tüchtig umgeschüttelt und im Dampftopf erkalten gelassen. Es bildet sich dann ein Bodensatz, über dem ein ziemlich klarer Agar steht. Der Agar muß einen hellen, gelblichweißen Farbenton haben. Er darf beim Kochen nicht braun geworden sein. Ist dies der Fall so war der Alkalizusatz zu hoch gewesen. Auf dem stark alkalischen Agar wachsen die Typhusbacillen viel schlechter als auf schwach alkalischem Agar.

Zum Gebrauch wird der Agar in den Flaschen durch Kochen während einer Stunde im strömenden Dampf flüssig gemacht. Zu 100 cm^3 des klaren, durch einfaches Abgießen gewonnenen flüssigen Agars werden, nachdem er auf etwa 45° abgekühlt ist, hinzugefügt:

1. 3 cm^3 durch Kochen sterilisierter und filtrierter Rindergalle;
2. 1 cm^3 einer 0.2%igen sterilisierten wässerigen Lösung von Safranin rein Dr. Grübler;
3. 3 cm^3 einer 1%igen sterilisierten wässerigen Lösung von „Reinblau doppelt konzentriert“ (Höchst);
4. 3—4 cm^3 einer 0.2%igen sterilisierten wässerigen Lösung von Malachitgrün Chlorzinkdoppelsalz.

Nach guter Durchmischung, die man am besten in einem Kolben vornimmt, wird der Agar in Petrischalen ausgegossen. Die fertigen Platten sehen blau aus. Im durchfallenden Lichte besitzen sie einen leicht bläulichvioletten Farbenton.

14. *P a d l e w s k i* - A g a r.

Zu 3% Fleischwasseragar mit 2% Pepton, Reaktion schwach alkalisch, fügt man 1% chemisch reinen Milchzucker und 3% natürliche Rindergalle hinzu. Der Agar wird zu 100 cm^3 abgefüllt und 3 Tage je $\frac{1}{2}$ Stunde im Dampftopf sterilisiert. Sodann bereitet man *a*) eine 1%ige wässerige Lösung von Malachitgrün krystallisiert chemisch rein; *b*) eine 10%ige wässerige Lösung von schwefligsaurem Natrium (Na_2SO_3). Zu je 100 cm^3 des Agars werden nun beigefügt: 0.5 cm^3 der Lösung *a* und 0.75—1.0 cm^3 der Lösung *b* sowie außerdem noch 0.5 cm^3 sterilisierte Rindergalle. Die Mischung muß von schwach grüner Farbe sein. Nach dem Erstarren und Abkühlen sollen die Platten völlig klar, von gewöhn-

lich gelblicher Farbe, ohne grüne Farbentönung sein. Der nachträgliche nochmalige Gallezusatz soll jegliche Ausflockung in dem fertigen Nährboden verhindern.

Das Prinzip dieses Nährbodens ist das gleiche wie beim *Marpmannschen* Malachitgrün- und beim *Endoschen* Fuchsinagar. Bakterien, die Milchzucker unter Säurebildung zerlegen, färben durch Oxydation das reduzierte Malachitgrün wieder grün. Der Gallezusatz soll noch besonders das Wachstum der Typhusbacillen begünstigen. *Bacterium coli* wächst auf dem *Padlewski*-Agar in grünen, undurchsichtigen, großen, runden, der Typhusbacillus dagegen in zuerst farblosen, später schön goldig-gelben, kleineren, durchsichtigen, leicht irisierenden Kolonien.

15. Chinablau-Malachitgrün-Agar nach Bitter.

Zu 1 l Fleischwasser werden 7 cm³ Normalsalzsäure und 30 g zerschnittener Stangenagar gefügt; das Ganze wird $\frac{3}{4}$ Stunden im Dampftopf bei 100° gehalten. Darnach setzt man 1 % Pepton Witte, 0·5 % NaCl und 2 % Milchzucker hinzu, läßt einige Minuten aufkochen und neutralisiert gegen Lackmus mit Normalnatronlauge. Zu je 100 cm³ dieses Gemisches setzt man 8 Tropfen einer gesättigten wässrigen (etwa 12%igen) Lösung von Chinablau Höchst und 2·5 cm³ einer 0·1%igen Lösung von Malachitgrün extra krystallisiert, chemisch rein, Höchst hinzu. Der fertige Nährboden wird nochmals 10 Minuten im Dampf sterilisiert und zu nicht zu dicken Platten gegossen.

Bacterium coli wird auf diesem Nährboden etwas weniger zurückgehalten als auf dem ursprünglichen *Loefflerschen* Malachitgrünagar und bildet lebhaft blaue Kolonien. Typhus- und Paratyphusbacillen wachsen in farblosen, durchscheinenden Kolonien. *Proteus* und *Pyocyaneus* wachsen ebenfalls farblos, sind jedoch bei einiger Übung wegen ihrer geringeren Durchsichtigkeit leicht von Typhuskolonien zu unterscheiden. Paratyphuskolonien bilden nach 48 Stunden bei Zimmertemperatur einen erhabenen wallartigen Rand.

16. Chinagrünagar nach Werbitzky.

500 g knochen-, sehn-, und fettfreies Rindfleisch werden in der Hackmaschine zerkleinert und in einem Emailtopf mit 1 l destilliertem Wasser versetzt und verrührt. Das Gewicht von Topf + Deckel + Rührstab + Inhalt wird festgestellt und dann das Ganze auf dem Gasbrenner unter fortwährendem Umrühren zum Kochen gebracht. Nach $\frac{3}{4}$ stündigem Kochen wird der Gewichtsverlust durch Wasserzusatz ersetzt. Nunmehr wird das Fleischwasser durch ein reines Koliertuch gegeben, die Kolatur im Meßzylinder gemessen, mit 1 % Peptonum siccum Witte und 0·5 % Kochsalz versetzt. Das Gemisch wird dann nochmals zum Sieden gebracht, sodann der Topf mit dem Deckel in ein kaltes Wasserbad gestellt, der Inhalt durch Fließpapier filtriert.

Das Filtrat wird mit 3 % Agar versetzt und bis zur Lösung im Dampftopf gehalten, darnach mit Natronlauge neutralisiert. Die Re-

aktion soll einem Gehalt von 1·3% Normalnatronlauge unter dem Phenolphthaleinneutralpunkt entsprechen; die ausfallenden Salze werden beim Erhitzen ausgeschieden, sodann wird die Lösung im Dampftopf filtriert, auf *Erlenmeyersche* Kölbchen zu je 100 cm³ abgefüllt und sterilisiert; direkt vor dem Gebrauch sind zu 100 cm³ verflüssigtem und auf 60—65° abgekühltem Agar 1·4—1·5 cm³ 0·2%ige Chinagrünlösung zuzusetzen (Chinagrün der Bayerischen Farbwerke).

Der Nährboden soll zur Vorkultur dienen wie der Malachitgrünagar nach *Lentz* und *Tietz*.

17. Pikrinsäure-Brillantgrün-Agar nach *Conradi*.

1 l Agar besteht aus 900 cm³ Wasser, 30 g Fadenagar, 20 g *Liebigs* Fleischextrakt und 100 cm³ einer 10%igen wässerigen *Witteschen* Peptonlösung. Der Zusatz der filtrierten und sterilisierten Peptonlösung erfolgt erst, nachdem die Sterilisation des Agars und seine Filtration durch Watte beendet ist. Dann wird die Reaktion des Pepton-Fleischextraktagars hergestellt und soviel Normalnatronlauge bzw. Normalphosphorsäure zugefügt, daß vom Phenolphthaleinneutralpunkt ab der Säuregrad 3% beträgt, d. h. zur Neutralisierung von 100 cm³ Agar gegen Phenolphthalein 3 cm³ Normalnatronlauge erforderlich sind. Hierauf werden von einer 1⁰/₁₀₀igen wässerigen Lösung von Brillantgrün Krystall extra rein (Höchst) und einer 1%igen wässerigen Lösung von Pikrinsäure (*Dr. Grübler*-Leipzig) je 10 cm³ zu 1½ l Agar gegeben. Nach Durchmischung wird der klare, hellgrüne Agar in große Doppelschalen ausgegossen.

Auf diesem Nährboden zeigen die Typhus- und Paratyphuskolonien ein charakteristisches Wachstum: die 2—3 mm große, glattrandige Typhuskolonie ist hellgrün und durchsichtig, rundlich und flach, in der Mitte etwas dicker als am Rande. Bei schräg auffallendem Lichte hat die Kolonie ein mattes Aussehen. Mit Hilfe einer ca. 10fachen Lupenvergrößerung gewahrt man dann die charakteristische, hellglänzende, feinkörnige Struktur der Typhuskolonien, u. zw. besonders deutlich, wenn die Platte von einem dunklen Hintergrunde sich abhebt. Ähnlich sieht auch die Paratyphuskolonie aus, nur ist sie etwas größer und üppiger als die Typhuskolonie. *Bacterium coli* ist auf der Platte völlig ausgeschaltet.

18. Kongorotnährböden nach *v. Liebermann* und *Acél*.

1 kg zerriebenes Pferdefleisch wird eine Stunde mit 2 l Wasser gekocht, dann filtriert. Zusatz von 20 g Pepton, 20 g Nutrose, 10 g Kochsalz. Wieder eine Stunde kochen, dann filtrieren; 60 g Agar zusetzen, eine Stunde im Autoklaven erhitzen. Mit Sodalösung vorsichtig versetzen, bis die Flüssigkeit gegen Lackmus schwach alkalisch wird, wieder eine halbe Stunde kochen, dann im Sterilisator heiß filtrieren. Das Filtrat wird gemessen, zu je 100 cm³ werden 1·5 g Milchezucker in Substanz und 30 cm³ einer 1%igen wässerigen Lösung von Kongorot zugesetzt; hierauf wird der Nährboden nochmals sterilisiert.

Innerhalb 24 Stunden erscheinen die Kolikolonien auf der roten Platte als intensiv schwarz gefärbte Flecke mit rundem oder stellenweise auch gefranstem, lichtem Hof. Bei reichlicher Aussaat und weiterer Entwicklung wird fast die ganze Platte schwarz vom körnig ausgeschiedenen Kongofarbstoff. Typhuskolonien sind auf dieser Platte rot, ebenso Paratyphus-, Ruhr- und Cholerakolonien.

19. Elektivnährboden für Typhusbacillen nach K. E. F. Schmitz.

Es werden vom Schlachthofe, ohne besondere Vorsichtsmaßregeln, etwa 7—8 l Rinderblut bezogen. Das Serum dieses Blutes wird im Laboratorium abgegossen und zur späteren Verwendung zurückgestellt. Sodann wird der Blutkuchen gewogen und die doppelte Menge Wasser hinzugegeben. Dann wird das Gemisch gekocht. Hierbei ist zu beachten, daß die Erhitzung wohl unter ständigem Rühren geschehen muß, daß man sich aber hüten muß, den Blutkuchen zu sehr zu zerquetschen, weil die entstehende Bouillon zu schwer abzufiltrieren ist, wenn die Gerinnselstückchen ganz zersetzt sind. Nachdem das Gemisch etwa 5—10 Minuten im Kochen gehalten worden ist, wird die Flüssigkeit am besten zuerst durch ein Tuch, dann durch Watte oder Glaswolle abfiltriert. Sodann gibt man zu der Bouillon Pepton und Nutrose in den üblichen Mengen und schließlich etwa 3% Agar zu. Wenn letzterer ganz gelöst ist, wird das zu Anfang zurückgestellte Serum unter ständigem Rühren zugesetzt und das Ganze noch einmal kurz aufgekocht. Der nun fertige Agar wird in Flaschen mit Patentverschluß abgefüllt und einmal eine Stunde lang in strömendem Dampf sterilisiert. Öfteres Sterilisieren ist nicht zu raten, da hierdurch die gute Nährkraft leidet.

Zur weiteren Verarbeitung wird nur der oben stehende, klare Teil des Nährbodens benutzt.

Der *Drigalski-Conradi*-Zusatz wird zu diesem Serumagar in der üblichen Weise zugegeben.

Zur Bereitung des Kongorotnährbodens (*v. Liebermann-Acé*) stellt man sich eine Mischung von Milchzucker mit Kongorot in Substanz im Verhältnis von 15 : 1 her und gibt dann dem flüssigen Agar auf 100 cm³ 15 g der Mischung. Dieselbe löst sich augenblicklich, und der leuchtend rote Nährboden kann nun sofort in die Petrischalen ausgegossen werden.

Soll zu den Nährböden Coffein zugesetzt werden, so kann man entweder das hierzu benötigte Coffeinum purum in der nötigen Menge dem Agar gleich vor der Sterilisation zusetzen, oder aber man gibt das Coffein erst dann zu, wenn man den *Drigalski*-Zusatz oder den Kongorotzusatz zugibt. Immerhin ist es wertvoll, das Coffein auch dann vorher zu sterilisieren. Es ist dabei zu beachten, daß sich das Coffeinum purum in der Kälte erst in 80 Teilen Wasser löst, in heißem Zustande dagegen schon im Verhältnis 1 : 10 glatt gelöst wird. Um die genaue Menge des

benötigten Coffeins jeder beliebigen Agarmenge zugeben zu können, wird eine Coffeinaufschwemmung, die in 1 cm^3 0.1 g Coffeinum purum enthält, hergestellt. Diese Aufschwemmung wird mit dem zu verflüssigenden Agar in den Dampftopf gesetzt. Wenn dann der Agar flüssig geworden ist, ist auch das Coffein vollkommen gelöst und sterilisiert. Zu 100 cm^3 Agar werden 6 cm^3 der Coffeinelösung hinzugesetzt.

Nach *Schmitz* sind schlecht wachsende Typhusbacillen auf Agar, dem ca. 20 % Serum (in der angegebenen Weise) zugesetzt werden, zu üppigstem Wachstum zu bringen.

Auch sonst gut wachsende Typhusstämme zeigen auf den Serumnährböden ein wesentlich üppigeres Wachstum. Durch Verwendung des Serumagars zur Bereitung des Kongorotnährbodens ließen sich Typhusbacillen noch in tausendfach stärkerer Verdünnung nachweisen als mit dem gewöhnlichen Kongorotnährboden.

Durch Zusatz von 0.6 % Coffein zu dem Serum-Kongorot-Nährboden läßt sich eine absolute Hemmung der Kolibacillen erreichen, während Typhusbacillen noch gutes Wachstum zeigen.

Auch der *Drigalski-Conradi*-Nährboden wirkt durch Zusatz von Coffein absolut hemmend für Kolibacillen, jedoch zeigen auch Typhuskolonien eine zeitliche Hemmung, da sie erst nach 48 Stunden erscheinen.

20. Alizarinagar nach Guth.

1. 1 l Fleischwasseragar. In 1 l Rind- oder Pferdefleischwasser werden 30 g Stangenagar, 10 g Pepton und 5 g Kochsalz gelöst.

2. Eine Lösung von 0.6 g Natriumhydroxyd und 0.8 g Alizarin (Alizarin trocken von *Kahlbaum*) in 100 cm^3 Aqua dest.; man hält die Mischung einige Minuten im Sieden.

3. 10 g Zucker in 20–30 cm^3 Wasser gelöst.

Der Fleischwasseragar darf keine suspendierten Flocken enthalten, er muß klar sein und eine Alkalität von 0.02–0.03 % haben, 100 cm^3 müssen nach Zusatz von 5–7 cm^3 $\frac{1}{10}$ -Säure auf Lackmuspapier neutral, bzw. amphoter reagieren. Ist die Alkalität nicht genügend, so setzt man Natronlauge (nicht Sodalösung) hinzu. Die Milchezucker- und die heiße Alizarinlösung werden dem flüssigen alkalisierten Agar hinzugefügt.

Die Farbe des Nährbodens ist dunkelblau mit einem Stich ins Rötliche; zeigt er einen bräunlichen Ton, so war der Fleischwasseragar nicht genügend alkalisch. Da die Färbung sich dann nur durch einen verhältnismäßig großen Zusatz von Alkali korrigieren läßt, so tut man am besten, zunächst eine Probe mit 50 cm^3 Agar und 5 cm^3 Alizarinlösung zu machen und der Hauptmenge des Agars dann eventuell noch etwas Natronlauge zuzusetzen, bevor man die drei Lösungen zusammen gießt. Die fertige Mischung wird nochmals 30 Minuten im strömenden

Dampf sterilisiert. Da das Alizarin nicht gelöst, sondern nur suspendiert ist, so muß man vor dem Plattengießen gut umschwenken, um den Farbstoff möglichst fein zu verteilen.

Bacterium coli färbt den Nährboden gelb und hellt ihn auf, Typhusbacillen, die graublaue Kolonien bilden, lassen ihn undurchsichtig. Die Angehörigen der Paratyphus-Enteritis-Gruppe wachsen wie Typhusbacillen.

Besondere Versuche *Guths* zielten darauf hinaus, die säurebildenden Faecesbakterien auf den Alizarinagarplatten zu unterdrücken. Gute Erfolge hatte er hierbei mit dem von *Loeffler* zuerst vorgeschlagenen Malachitgrün. Dem fertigen Alizarinagar wurden auf je 100 cm^3 1·7 cm^3 einer 0·1%igen Malachitgrünlösung zugesetzt (Marke: Malachitgrün „Krystalle extra“ [Höchst]).

Bacterium coli wird auf diesen Alizarin-Malachitgrün-Platten meistens im Wachstum stark gehemmt. Aber auch die Typhusbacillen werden in ihrer Entwicklung stark geschädigt. Die Typhuskolonien treten meist erst nach 40—48 Stunden deutlich hervor.

21. Rosolsäure-Lactose-Blutagar nach *Mandelbaum*.

In 8—10 cm^3 Agar enthaltende Röhrrchen wird 0·3 g Milchzucker gebracht; die Röhrrchen werden verflüssigt und alsdann auf 50° abgekühlt. Nun bringt man in jedes Röhrrchen 0·3 cm^3 einer 1%igen alkoholischen Rosolsäurelösung und 1 cm^3 defibrinierten, sterilen Menschenblutes, schüttelt das Ganze gut durch und gießt das Gemenge in eine Petrischale aus. Die Platten läßt man bis zum Gebrauch gewöhnlich 24 Stunden stehen. Will man eine solche Platte sofort benutzen, so kann man sie $\frac{1}{2}$ Stunde in den Brutofen bei 37° zum Trocknen stellen.

Kolibacillen erscheinen bei durchfallendem Licht grünlich-braun bis schwarz. Sie bilden aus dem Milchzucker Säure, was sich durch Verfärbung des roten Blutfarbstoffes dokumentiert. Die Typhuskolonien, die Alkali bilden, lassen den Blutfarbstoff unverändert, erscheinen also bei durchfallendem Lichte rot.

Die Milchzucker-Rosolsäure-Blutagarplatte vermag das Wachstum der Bakterien nicht in dem Maße zu hemmen wie Rosolsäureagar allein. Der Zusatz von Blut hat die Wachstumsbedingungen auch für andere Mikroorganismen außer der Typhus-Koligruppe gebessert.

22. Wasserblau-Metachromgelbnährboden nach *Gaßner*.

Zu 2 l eines schwach lackmusalkalischen Hefewasser- oder Fleischwasser-Peptonagars füge man:

1. 125 cm^3 2%ige Metachromgelblösung (2 Minuten aufgekocht) [Metachromgelb II RD der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation Berlin];

2. 175 cm^3 1%ige Wasserblaulösung + 100 g Milchzucker (10 Minuten gekocht) [Wasserblau 6 B extra P der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation Berlin].

Getrenntes Aufkochen ist nötig, da sonst Fällungen auftreten, die die Wirksamkeit des Metachromgelbs beeinträchtigen und den Nährboden unansehnlich machen.

Der erhaltene Nährboden ist schön grün. *Bacterium coli* verfärbt ihn tiefblau; die Kolonien erscheinen in der Durchsicht blauschwarz, in der Aufsicht blaugrau. Typhus und Ruhr hellen den grünen Nährboden gelblich auf, wachsen in Durchsicht gesehen gelblich-glasig, in Aufsicht gelblichgrau. Der Farbumschlag ist sehr deutlich; er gestattet, auch unmittelbar nebeneinander und ineinander wachsende Kolonien scharf zu unterscheiden.

23. Stark alkalischer Agar mit Natriumsulfit-Fuchsinzusatz (Endo) nach *G. Felsenreich* zur Züchtung von Paratyphusbacillen.

2 kg fettfreies Rindfleisch werden zerkleinert und mit Brunnenwasser gekocht; dabei ist darauf zu achten, daß das Fleischwasser nach dreistündigem Sieden auf 4 l eingedampft wird. Jetzt filtriert man durch ein dreifach gelegtes Filtrierpapier und läßt über Nacht stehen, um das an der Oberfläche sich noch gelegentlich ansammelnde Fett vollständig abzuschöpfen. 1 l dieses Fleischwassers wird mit 30 g Agar, 10 g Pepton Witte, 10 g Nutrose und 5 g Kochsalz versetzt, im Dampf bei 100—105° gerade bis zur Lösung des Agars erhitzt und mittels 10%iger Natronlauge fast bis zum Phenolphthaleinpunkt (hellrosa) neutralisiert; alsdann Zusatz von 120 cm³ Normalkalilauge. Der Nährboden kommt wieder in den Dampftopf bis zur völligen Klärung der Flüssigkeit zurück. Der geklärte, aber durch den Alkalizusatz bräunlichschwarz gefärbte Nährboden wird durch angefeuchtete, im Dampf vorgewärmte Watte über einem verzinnnten, nicht kupfernen Drahtsieb filtriert. Der Agar läßt sich jetzt unbeschadet seiner Güte bei Zimmertemperatur sterilisiert aufbewahren, oder man kann sofort zum Ausgusse der Platten schreiten. Hierzu wird der benötigten, verflüssigten Menge des Agars 1·5% Milchezucker zugesetzt, dann 20 Minuten im Dampf sterilisiert, worauf 0·5% einer 10%igen alkoholischen Fuchsinlösung, 1% einer 10%igen Sodaauslösung und 4% einer 10%igen Natriumsulfitlösung zugefügt werden; jetzt sterilisiert man neuerdings 20 Minuten und gießt schließlich in Platten aus. Der Nährboden ist anfänglich bräunlichgelb und wird erst nach eintägigem Stehen bei Zimmertemperatur kirschrot. Die ausgegossenen Platten sind vor Licht geschützt durch ungefähr 2 Tage bei Zimmertemperatur aufzubewahren und können dann für die Kultur benutzt werden.

Nach den Untersuchungen von *G. Felsenreich* erträgt das *Bac. paratyphi B* hinsichtlich seines Wachstums eine relativ hohe Alkaleszenz des Nährbodens und wächst auch auf stark alkalischen Nährböden in recht typischer Form, während das Wachstum sonstiger Darmbakterien völlig oder fast völlig gehemmt wird. Bemerkt sei, daß es sich nach *Felsenreich*

empfehl, die Platten nach 18stündiger Bebrütung noch ungefähr einen Tag bei Zimmertemperatur stehen zu lassen, damit die Paratyphus-Bacillen möglichst gut sich entwickeln können, was nach 24 Stunden noch nicht der Fall ist.

IV. Spezialnährböden für Choleravibrionen.

1. Für den Nachweis von Choleravibrionen schreibt die amtliche Anweisung zur Bekämpfung der Cholera (Bundesratsbeschluß vom 9. Dezember 1915 [s. Veröffentlichungen des Reichsgesundheitsamtes 1916, S. 210 und Ministerialblatt f. Medizinalangelegenheiten 1916, S. 129]) die Verwendung folgender Nährböden vor;

a) Peptonlösung.

Herstellung der Stammlösung: In 1 l destilliertem, sterilisiertem Wasser werden 100 g Peptonum siccum Witte, 100 g Kochsalz, 1 g Kaliumnitrat und 20 g kohlensaures Natrium in der Wärme gelöst, die Lösung wird filtriert, in Kölbchen zu je 100 cm³ abgefüllt und sterilisiert.

Herstellung der Peptonlösung: Von der Stammlösung wird eine Verdünnung von 1 Teil mit 9 Teilen Wasser hergestellt und zu je 50 cm³ in Kölbchen und zu je 500 cm³ in größere Kolben abgefüllt und sterilisiert.

b) Fleischwasserpeptonagar.

$\frac{1}{2}$ kg in Stücken gekauftes und im Laboratorium zerkleinertes fettfreies Rindfleisch wird mit 1 l Wasser angesetzt, 24 Stunden lang in der Kälte digeriert, $\frac{1}{2}$ Stunde lang gekocht und durch ein Sehtuch gepreßt. Von diesem Fleischwasser wird 1 l mit 10 g Peptonum siccum Witte und 5 g Kochsalz versetzt, $\frac{1}{2}$ Stunde lang gekocht, mit Soda-lösung neutralisiert, $\frac{3}{4}$ Stunden lang gekocht und filtriert. Zu 1 l der so gewonnenen Fleischwasserpeptonbrühe werden 30 g Agar hinzugesetzt, bis zur Lösung des Agars gekocht und neutralisiert. Zur Herstellung der für Choleravibrionen geeigneten Alkaleszenz fügt man zu je 100 cm³ 3 cm³ einer 10%igen Lösung von krystallisiertem, kohlensaurem Natrium hinzu. Sodann wird der Agar nochmals $\frac{3}{4}$ Stunden gekocht, filtriert und, in Kölbchen oder Röhrechen gefüllt, fraktioniert sterilisiert.

c) Dieudonné-Agar.

Rinderblut wird in großen, Glasperlen enthaltenden sterilisierten Flaschen aufgefangen, defibriniert und mit gleichen Mengen Normalkalilauge versetzt; diese Mischung wird $\frac{3}{4}$ Stunden lang gekocht und ist dann bei Aufbewahrung in fest verschlossenen Flaschen einige Monate haltbar*.

* van Loghem und Nieuwenhuijsè überschichteten die frisch bereitete Blut-Alkali-Mischung mit Paraffinum liquidum und konnten die Blutmischung längere Zeit (über 10 Monate) ohne Schaden für die Elektivität erhalten. 7—14 Tage nach

Von dieser Blutalkalimischung werden 3 Teile mit 7 Teilen neutralem 3%igen Agar vermischt und zu Platten gegossen. Die Platten müssen wenigstens 24 Stunden stehen und werden dann noch, wenn nötig, durch $\frac{1}{2}$ stündiges Einstellen in den Brutofen getrocknet, ehe sie gebrauchsfertig sind. Über 8—10 Tage alte Platten sollen nicht mehr verwendet werden.

Sind brauchbare *Dieudonné*-Platten nicht vorrätig, so kann man sich sofort verwendbare Blutalkalipplatten nach *Esch* dadurch bereiten, daß man 5 g käufliches Hämoglobin im Mörser zerreibt, in 15 cm³ Normalnatronlauge + 15 cm³ destilliertem Wasser löst, diese Lösung 1 Stunde im Dampftopf sterilisiert und von ihr 15 cm³ zu 85 cm³ neutralem Agar gibt.

2. Blutalkaliagar, modifiziert nach *Neufeld* und *Woithe*.

Um einen sofort brauchbaren Nährboden zu erhalten, werden unmittelbar vor dem Ausgießen zu Platten auf 100 cm³ des Nährbodens 2 cm³ 10%ige Milchsäure behufs Bindung des Ammoniaks, bzw. zur Neutralisierung eines etwaigen Überschusses der nach dem langen Kochen etwa noch überschüssigen Lauge hinzugesetzt. Bei diesem Vorgehen ist der Nährboden nach $\frac{1}{4}$ stündigem Trocknen der Platten im Brutschrank bei 60° sofort brauchbar. Er behält aber seine Elektivität für Cholera nur verhältnismäßig kurze Zeit, weil nach 24—48 Stunden die Alkaleszenz des Nährbodens bereits infolge der durch den Säurezusatz bedingten, fortschreitenden Neutralisation stark herabgemindert wird.

3. Blutalkaliagar, modifiziert nach *Pilon*.

Defibriertes Blut — am besten Schweineblut — wird mit 12%iger Sodalösung zu gleichen Teilen gemischt; diese Blutsodamischung wird neutralem 4%igen Agar im Verhältnis 3:7 zugesetzt. Die mit diesem Nährboden gegossenen Platten sind nach der Abkühlung und $\frac{1}{4}$ stündiger Trocknung bei 60° gebrauchsfähig.

4. Blutalkaliagar, modifiziert nach *Moldavan*.

Blutalkali und Agar werden nicht in dem von *Dieudonné* angegebenen Verhältnis von 3:7, sondern von 1:4 gemischt. Bei diesem Mischungsverhältnis sind die gegossenen Platten bereits nach 6 Stunden verwendungsfähig.

5. Blutalkaliagar, modifiziert nach *Hofer* und *Hovorka*.

Zu 3%igem neutralen Agar, 80 cm³, fügt man Rinderblut, defibriert, 4 cm³, Normalkalilauge 16 cm³ gekocht und zu je 10 cm³ der Mischung von Agar und Blutalkali 0.5 cm³ einer 0.1%igen Krystallviolettlösung in Aqua destillata; hierauf wird nochmals kurz aufge-

der Übersichtung liefert sie mit Nähragar Platten, welche zur Kultur der Choleravibrien sofort geeignet sind. Sie behält von diesem Augenblick an mit ihrer sofortigen Gebrauchsfertigkeit auch ihre Elektivität.

kocht (*Fügner*). Die gegossenen Platten sollen zur Konsolidierung nach Möglichkeit 24 Stunden im Brutkasten etwas geöffnet und weitere 12 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten werden.

6. Hämoglobinextrakt-Alkaliagar nach *Kabeshima*.

Man bringt 80 cm³ im Dampftopf aufgeschmolzenen, neutralen 3%igen Nähragar in ein Erlenmeyerkölbchen, setzt 10 cm³ 18%iger Sodalösung hinzu und kocht diese Mischung etwa 10 Minuten. Wenn dann dieser starke alkalische Nähragar auf etwa 50° abgekühlt ist, fügt man 3 g Hämoglobinextrakt Pfeuffer (München), in 10 cm³ 0·85%ige Kochsalzlösung aufgelöst, hinzu und gießt diese Mischung nach guter Vermengung sofort in 7 Petrischälchen. Diese läßt man offen stehen, bis der Agar erstarrt ist. Der Nährboden ist sofort verwendbar.

7. Hämoglobinextrakt - Alkalisodaagar nach *Baerthlein* und *Gildemeister*.

3·5 g Hämoglobinextrakt Pfeuffer (München) werden in 10 cm³ physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst, dann die gleiche Menge einer 5·5%igen Lösung von wasserfreier Soda, sog. Sodamehls, und 2 cm³ Kalilauge zugesetzt und das Ganze $\frac{1}{4}$ Stunde im Dampftopf sterilisiert.

Nach Abkühlung der Lösung auf unter 50° wird sie mit 80 cm³ 3%igem, genau auf den Lackmusneutralpunkt eingestelltem 80—90° heißen Agar gemischt und nach kräftigem Umrühren sofort in Petrischalen ausgegossen. Etwaige Niederschläge im Nährboden sind bedeutungslos. Nach kurzer Trocknung im Brutschrank zur Entfernung des Kondenswassers ist der Nährboden sofort verwendungsfähig.

8. Chlorophyllnährboden nach *Seiffert* und *Bamberger*.

Zu 60 cm³ einer 10%igen Sodamehllösung werden 25 cm³ einer käuflichen alkoholischen Chlorophylllösung zugesetzt und die Mischung 1 Stunde im Dampftopf erhitzt. Dann werden 50 cm³ einer sterilen Rohrzuckerlösung (20%ig) und 50 cm³ einer sterilen 20%igen Dextrinlösung zugefügt und das Ganze mit 1 l Neutralagar vermischt. Dem Agar werden vor Benutzung 4 cm³ alkoholische Diamantfuchsinlösung und tropfenweise bis zur Entfärbung 10%ige Natriumsulfitlösung zugesetzt. Es dürften ca. 15 cm³ dieser stets frisch zu bereitenden Natriumsulfitlösung für Entfärbung der angeführten Menge genügen. Die Diamantfuchsinlösung wird nach *Aronson* hergestellt, indem man absoluten Alkohol während 24 Stunden im Brutschrank mit überschüssigem Diamantfuchsin unter öfterem Umschütteln zur Lösung stehen läßt. Die gegossenen Platten kann man offen trocknen lassen, bis das Kondenswasser verdampft ist. Es ist vorteilhaft, den Chlorophyllagar frisch zu bereiten und sofort in Platten auszugießen, da bei wiederholtem Erhitzen ein weiterer Abbau des Chlorophylls erfolgt; mehrfach erhitzter Chlorophyllagar besitzt nicht mehr die stark elektive Wirkung des frisch zubereiteten Nährbodens. Der Nährboden ist sofort benutzbar.

Bei Prüfung verschiedenster Chlorophyllpräparate erwies sich das Chlorophyll Merck „Solutio spirituosa“ sehr brauchbar.

9. Fleischnatronagar nach Esch.

500 g mageres, zerkleinertes Rindfleisch oder in Würfel geschnittenes Fischfleisch werden in einem Aluminiumtopfe unter Erhitzen und stetigem Umrühren in 250 cm³ Normalnatronlauge gelöst. Nach dem Erkalten wird die Lösung durch ein Cambricsieb filtriert. Hiernach wird sie eine Stunde lang im Dampftopf sterilisiert, um dann nach Bedarf mit Neutralagar im Verhältnis von 3 : 7 gemischt zu werden. Die Nährbodenplatten müssen erst $\frac{1}{2}$ Stunde bei 60° abtrocknen und dann 24 Stunden offen stehen, ehe sie besät werden dürfen.

10. Rohrzuckerfuchsinagar nach Aronson.

Als Grundlage dient ein 3·5%iger Agar. 35 g Agar werden am besten am Tage vorher zu 1 l Leitungswasser gegeben, dann wird die Masse nach Zusatz von 10 g Fleischextrakt, 10 g Pepton und 5 g Kochsalz 4—5 Stunden in strömendem Dampf gekocht. Der Kolben wird schräge gestellt und nach Absetzen der nicht gelösten Teile mittels eines vorher graduierten Kölbchens zu je 100 cm³ in sterilisierte, 200 bis 250 cm³ fassende Erlenmeyer-Kolben überführt. Will man eine größere Anzahl Platten gießen, so kann man natürlich gleich größere Quantitäten dieses schwach sauer reagierenden Agars verarbeiten.

Man hält folgende Lösungen vorrätig:

1. 10%ige Lösung von Natr. carbonic. siccum;

2. 20%ige Lösung von Rohrzucker (der chemisch nicht rein zu sein braucht);

3. 20%ige Lösung von Dextrin, die stets trübe ist.

Diese drei Lösungen werden durch $\frac{1}{2}$ stündiges Erhitzen in strömendem Dampf sterilisiert.

4. Gesättigte alkoholische Fuchsinlösung. Um eine wirklich gesättigte Lösung zu erhalten, wird das in größeren Stücken in den Handel kommende Diamantfuchsin in der Reibschale fein zerrieben, das Pulver in einer Flasche mit absolutem Alkohol übergossen, wobei ein reichlicher Überschuß des Farbstoffes vorhanden sein muß. Die Flasche wird unter öfterem Schütteln einen Tag im Brutschrank gelassen.

5. 10%ige Lösung von Natriumsulfit. Die Lösung wird durch einmaliges Aufkochen sterilisiert; die Wirksamkeit läßt bei längerem Aufbewahren nach; sie darf daher nicht zu alt sein.

Auf 100 cm³ des noch heißen Agars werden 6 cm³ der 10%igen Natr. carbon. sicc.-Lösung zugegeben; das Kölbchen wird dann 10 bis 15 Minuten in strömendem Dampf bei 100° gehalten, wobei die Masse eine dunkelbräunliche Farbe annimmt und stark trübe wird. Bald nach der Herausnahme aus dem Sterilisationsapparat werden 5 cm³ 20%iger Rohrzuckerlösung, 5 cm³ 20%iger Dextrinlösung, 0·4 cm³ der gesättigten

alkoholischen Fuchsinlösung und 2 cm^3 10%iger Natriumsulfitlösung zugesetzt.

Das noch sehr heiße Kölbchen wird schräge gelegt, worauf sich der reichliche Niederschlag schnell zu Boden setzt. Wenn dieses geschehen, werden unter vorsichtigem Gießen 2 Platten hergestellt, wobei der Bodensatz zurückbleibt. Die Platten sind durchsichtig, von gelbbraunlicher Farbe. Sie müssen vor dem Gebrauch getrocknet werden. Die fertigen Platten halten sich beim Aufbewahren im Dunkeln einige Tage, wobei eine geringe, nicht störende Rötung eintritt.

Der Aronsonsche Nährboden beruht auf der Kombination von zwei verschiedenen Prinzipien. Die Choleravibrionen besitzen ein hervorragendes Spaltungsvermögen für fast sämtliche Kohlehydrate, u. zw. scheint es umso größer zu sein, je frischer die Kultur aus Stuhl gezüchtet ist. Sie zersetzen nicht allein Milchzucker, sondern in höherem Maße Rohr-zucker, weiter auch Traubenzucker, Maltose, Mannit. In geringer Intensität müssen auch Stärke und Dextrin angegriffen werden; denn auf mit Fuchsin und Natriumsulfit versetztem Agar, der diese Stoffe enthält, bilden Cholerakeime blaßrote Kolonien. Da die meisten Koliarten nicht das Vermögen haben, Rohr-zucker anzugreifen, so wird durch seine Anwendung an Stelle des Milchzuckers bei der Endoplatte schon ein großer Vorteil erreicht, indem bei vielen Stühlen andere rot wachsende Kolonien überhaupt nicht auftreten. Immerhin gibt es noch eine beträchtliche Anzahl von Kolirassen, welche auch auf einem solchen Nährboden rot wachsen.

Das zweite Prinzip, das zur Verbesserung des *Endo*-Agars dient, ist auf der Fähigkeit der Choleravibrionen begründet, auch bei sehr starkem Alkaligehalt des Nährbodens zu gedeihen, der die Vermehrung der Kolibacillen hemmt, bzw. völlig unterdrückt.

Der Rohr-zucker, dessen Spaltung durch die fuchsin-schweflige Säure angezeigt wird, dient außerdem zur Beförderung des Wachstums der Choleraerreger. Zu demselben Zweck dient der Dextrinzusatz.

11. Rohr-zucker-malachitgrünagar nach Erich Hesse.

35 g Agar + 1 l Leitungswasser, am nächsten Tage Zusatz von 10 g Fleischextrakt, 10 g Pepton Witte, 5 g NaCl. 4—5 Stunden im Dampftopf, nicht filtrieren, sondern durch Schrägstellen absetzen lassen, abfüllen. Zu je 100 cm^3 des noch heißen Agars 4 cm^3 einer 10%igen Lösung von Natrium carbonicum siccum (chemisch rein), 10—15 Minuten Dampftopf, dann Zusatz von 5 cm^3 steriler 20%iger Rohr-zuckerlösung, 5 cm^3 20%iger Dextrinlösung und 0.4 cm^3 gesättigter alkoholischer Lösung von Malachitgrün (Chlorzinkdoppelsalz, kryst., chemisch rein). Entfärben mit 1.5—2 cm^3 einer frisch bereiteten 10%igen Lösung von Natriumsulfit.

V. Spezialnährböden für Influenzabacillen.

1. Blutagar nach R. Pfeiffer.

Steril aufgefangenes Blut wird tropfenweise auf die Oberfläche von schräg erstarrten Agarröhrchen gebracht und verrieben. Sämtliche Blutarten üben die gleiche spezifische Wirkung auf das Wachstum der Influenzabacillen aus. Besonders üppig ist das Wachstum auf Taubenblut. Das Hämoglobin ist derjenige Anteil des Blutes, welcher den Influenzabacillen für ihr Gedeihen unentbehrlich ist.

2. Blutagar nach Levinthal.

100 oder 200 cm^3 2—3%iger Nähragar, verflüssigt und auf etwa 70° abgekühlt, werden im Erlenmeyerkolben tropfenweise mit Blut versetzt und gut gemischt. Man verwendet entweder frisches Kaninchen- oder Menschenblut. Die Menge des Blutzusatzes zum Agar darf in gewissen Grenzen schwanken (etwa 5% am besten).

Das flüssige, frischrote Blutagargemisch wird sofort auf dem Drahtnetz über der Flamme erhitzt, bis es zu sieden und in den Kolbenhals aufzusteigen beginnt. Schnellstes Absetzen von der Flamme und sofortiges zweimaliges Wiederholen des Aufsiedens und Umschüttelns. Hierbei ballen sich Serum und Globulin in groben, braunschwarzen Gerinnseln zusammen, die meist rasch im Agar zu Boden sinken. Oft kann man ohneweiters dekantieren; manchmal ist es nötig, durch ein ganz dünnes Wattefilter oder besser mehrfach gefaltete Gaze von mittlerer Weite steril zu filtrieren und zur Sicherheit noch einmal aufzukochen. Auch die Alkaleszenz ist zu kontrollieren; es muß leichteste Bläuung von Lackmuspapier eintreten.

3. Blutagar nach amerikanischer Vorschrift (zit. nach Hundeshagen).

Der im Reagensglase enthaltene Agar wird im Wasserbade verflüssigt und bei einer Temperatur von etwa 96° mit ein wenig Hammelblut versetzt, worauf man ihn in schräger Lage erstarren läßt oder zu Platten ausgießt.

4. Blutagar nach Hundeshagen.

Defibriniertes Kaninchen- oder Menschenblut, das im Eisschrank vorrätig gehalten werden kann, wird mit der gleichen Menge Brunnenwasser vermischt, welchem etwa 20% Normalnatronlauge zugesetzt sind; Mischung erfolgt erst nach Sterilisierung dieses alkalischen Wassers. Im Laufe etwa einer Stunde erfolgt Auflösung der roten Blutkörperchen; bei Verwendung ganz frischen Blutes erfordert die Lösung noch etwas längere Zeit. Von der entstandenen alkalischen Blutlösung werden etwa 10% dem verflüssigten und auf etwa 50° abgekühlten, nicht neutralisierten Agar zugesetzt. Nach gründlicher Mischung des Agars und der Blutlösung wird der Nährboden in Petrischalen ausgegossen oder auf Röhrchen abgefüllt. Hammelblut erwies sich als gänzlich ungeeignet zur Züchtung von Influenzabacillen auf diesem Nährboden.

Hundeshagen gibt dem Blutagar der Amerikaner den Vorzug vor seinem Nährboden.

5. Blutagar nach *Aguilhon* und *Legroux*.

Blutextrakte, die durch 15 Minuten langes Erhitzen vierfach mit Kochsalzlösung verdünnten Blutes auf 80° und nachherige sterile Filtration gewonnen waren, werden in Mengen von 5—10% den üblichen Agarnährböden zugesetzt.

6. Staphylokokkenblutagar oder Bouillon nach *E. und Th. Savini*.

5 cm³ Glycerin werden in einem Erlenmeyerkölbchen sterilisiert; darauf Zusatz entweder einer Bouillonkultur von *Staphylococcus pyogenes aureus* oder von 2—3 24—48stündigen Schrägagarkulturen, abgeschwemmt und bei 58—60° abgetötet. Hierauf Zusatz von 3—4 cm³ steril entnommenem Blut und Schütteln, bis völlige Gerinnung eingetreten ist. Das Gemisch wird alsdann wieder 5 Stunden bei 56—58° gehalten. Der Wattestopfen ist lose aufzusetzen, um eine ausgiebige Verdunstung zu erreichen. Die Blutart ist gleichgültig. Von dieser Stammlösung, die im Eisschrank längere Zeit haltbar ist, wird etwa 1 cm³ auf je 10 cm³ Nähragar gegeben; nach gründlicher Mischung des Agars mit dem Blute — Schaumbildung ist zu vermeiden — läßt man den Nährboden schräg erstarren. Oder man gibt ins Kondenswasser der Agarröhrchen 1—2 Tropfen der Stammlösung und breitet sie mit einer Öse über der Agaroberfläche aus. Bouillon wird zu 2—3 cm³ in Röhrchen abgefüllt und mit 1—2 Tropfen der Stammlösung versetzt.

VI. Spezialnährböden für Keuchhustenbacillen.

1. Glycerin-Kartoffel-Blutagar nach *Bordet* und *Gengou*.

Zu 200 cm³ 4%iger wässriger Glycerinlösung fügt man 100 g zerschnittene Kartoffeln und kocht das Ganze im Autoklaven; sodann nimmt man 50 cm³ von der über dem Bodensatz befindlichen Flüssigkeit, die einen konzentrierten Glycerinextrakt aus Kartoffeln darstellt, und fügt 150 cm³ 0.6%ige Kochsalzlösung und 5 g Agar hinzu. Dieses Gemisch wird im Dampftopf gelöst; alsdann wird die noch heiße Flüssigkeit zu 2—3 cm³ in Reagensgläser gefüllt und sterilisiert. Zu dem flüssigen Kartoffelagar setzt man gleiche Teile steriles defibriniertes Blut vom Kaninchen oder noch besser vom Menschen. Kartoffelagar und Blut sind sorgfältig zu mischen, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Blutes innerhalb des Nährbodens zu erreichen. Hierauf läßt man die Röhrchen schräg erstarren.

Shiga, Imai und *Eguchi* empfehlen, statt der physiologischen Kochsalzlösung Nährbouillon und statt Kaninchenblut Blut vom Pferde zu nehmen.

2. Menschenblutagar nach *C. Fraenkel*.

Gewöhnlicher Nähragar wird in der üblichen Weise mit Menschenblut versetzt. Nach *Inada* gibt eine Mischung von 10 cm³ 3% igem Agar mit 2 cm³ defibriniertem Ziegenblut einen guten Nährboden.

3. Eibouillon nach *Besredka* und *Jupille* (s. S. 582).

VII. Spezialnährböden für *Ducreysche Streptobacillen*.

1. Hautpeptonblutagar nach *Lenght*.

20 Teile fein zerkleinerter Menschenhaut, 50 Teile destilliertes Wasser, 1 Teil Pepsin und 1—3 Tropfen Salzsäure werden einige Stunden hindurch bis zur gänzlichen Verdauung einer Temperatur von 40—45° ausgesetzt. 2 Teile dieses Peptons kommen auf 100 Teile Agar, dessen Oberfläche mit etwas Menschenblut beschickt wird.

2. Blutagar nach *Besançon*, *Griffin* und *la Sourd*.

2 Teile verflüssigten und auf 50° abgekühlten Agars werden mit 1 Teil Kaninchenblut, eventuell auch Menschen- oder Hundeblood, gemischt. *Lipschütz* bestätigt die Brauchbarkeit dieses Blutagars. *R. Stein* läßt das Blut unmittelbar aus der Carotis des Kaninchens in die Agar-röhrchen einlaufen.

VIII. Spezialnährböden für *Meningokokken*.

1. Ascitesagar.

1 Teil Ascitesflüssigkeit und 3 Teile 2·5—3% iger neutraler Agar (*v. Lingelsheim*). *Jochmann* empfiehlt einen Zusatz von 1½% Traubenzucker.

2. Serumagar.

1 Teil Serum von Schaf, Ziege, Rind und 3 Teile Agar (*von Lingelsheim*).

3. Blutagar.

1 Teil Menschen- oder Tierblut mit 5—10 Teilen Agar.

4. *Loeffler*-Serum (s. S. 578).

5. Placenta-Serumagar nach *Kutscher*.

Die möglichst frische Placenta wird in kleine Stücke zerschnitten und mit dem ausfließenden Gewebssaft u. s. w. abgewogen. Unter Zusatz der doppelten Gewichtsmengen wird nun wie aus Fleisch in der üblichen Weise ein 2·5% iger Agar bereitet, dem 0·5% Kochsalz, 1% Traubenzucker, 2% Nutrose und 2% Pepton Chapoteaux zugefügt werden. Der schwach alkalisch reagierende Agar wird in kleinen Kölbchen zu 100 cm³ sterilisiert. Zu 3 Teilen diese Agars wird, um den fertigen Nährboden zu erhalten, 1 Teil sterilen Rinderserums hinzugesetzt. Beide Hauptkomponenten des fertigen Nährbodens, Placentaagar und Rinderserum, können vorrätig gehalten werden. Der Nährboden eignet sich wie Ascitesagar zur Erstzüchtung.

6. Rinderblutserum nach *Buchanan*.

Dieser Nährboden stellt eine Modifikation des *Loeffler*-Serums dar, er besteht aus 75 Teilen Rinderblutserum, 25 Teilen Bouillon, 1% Dextrose mit einem Zusatz von Neutralrot im Verhältnis von 0·5 : 10.000. Die Meningokokken wachsen rot auf diesem Nährboden.

7. Ascites-Blut-Maltoseagar nach *Esch*.

60 cm³ Peptonagar, 20 cm³ steriles defibriniertes Hammelblut, 10 cm³ Ascites und 1 g Maltose, gelöst in 3 cm³ Bouillon. Das Wachstum der Meningokokken soll auf diesem Nährboden besonders schnell erfolgen.

8. Verwendung von Lumbalflüssigkeit zu Nährböden nach *Conradi*.

In Fällen, in denen Ascitesflüssigkeit nicht zu beschaffen ist, wird die mit Agar vermischte Lumbalflüssigkeit des Kranken zur Züchtung der Meningokokken verwendet. 10—20 cm³ der Lumbalflüssigkeit werden klar zentrifugiert und 1—2 Stunden lang bei 60° gehalten, sodann im Verhältnis von 1 : 3 mit lackmusneutralem, auf 45° abgekühltem Agar vermischt und zu Platten ausgegossen.

9. Nutroseserumagar nach *v. Wassermann* (s. S. 619).

10. Serumnährböden nach *Ungermann* (s. S. 575).

Vornehmlich für Dauerkulturen geeignet.

IX. Spezialnährböden für Gonokokken.

1. Erstarrtes menschliches Blutserum nach *Bumm*.

Das Blutserum gewinnt man zweckmäßig aus Placenten.

2. Menschenblutserumagar nach *Wertheim*.

Zur Erstzüchtung: 1 Teil menschliches Blutserum, auf 40° erwärmt, wird mit 1 Teil verflüssigten und auf 40° abgekühlten Fleischwasseragars (2% Agar, 1% Pepton, 0·5% NaCl) gut gemischt und zu Platten gegossen. Zur Fortzüchtung genügt 1 Teil menschliches Serum auf 2—3 Teile des Fleischwasseragars. Statt des menschlichen Blutserums läßt sich auch tierisches Blutserum, z. B. Rinderserum, mit Agar zur Kultivierung des Gonokokkus verwenden; das Wachstum ist allerdings nicht so üppig wie auf Menschenserumagar.

3. Blutagar.

1 Teil defibriniertes Blut + 2 Teile Nähragar.

4. Blutagar nach *Abel*.

Die Agarflächen werden mit sterilem menschlichen Blut bestrichen, das man durch Einstich in die eigene, vorher desinfizierte Haut gewinnt.

5. Pepton-Glycerin-Ascitesagar nach *Kiefer*.

Ascitesflüssigkeit wird zu gleichen Teilen mit geschmolzenem und auf 40° abgekühltem Nähragar, welcher unter Benutzung von 3½% Agar, 5% Pepton, 0·5% NaCl und 2% Glycerin bereitet ist, gemischt.

6. Nutroseserumnährboden nach v. Wassermann.

Man gibt in ein Erlenmeyersches Kölbchen 15 cm^3 möglichst hämoglobinfreies Schweineserum, verdünnt dieses mit $30\text{--}35\text{ cm}^3$ Wasser, fügt $2\text{--}3\text{ cm}^3$ Glycerin und endlich $0.8\text{--}0.9\text{ g}$ Nutrose (Caseinnatriumphosphat) hinzu. Durch Umschütteln wird das Ganze möglichst gleichmäßig verteilt und über der freien Flamme unter stetem Umschütteln zum Kochen gebracht. Die vorher trübe Flüssigkeit klärt sich beim Kochen und kann nun beliebig lange zwecks Sterilisierung erhitzt werden. Bei frischem Serum genügt hierzu im allgemeinen eine Sterilisierung von 20 Minuten; bei schon gestandenem Serum muß dies länger und am besten über mehrere Tage ausgedehnt werden. Diese Lösung kann, sobald sie einmal sicher sterilisiert ist, unbegrenzt aufgehoben werden, und man ist dann imstande, in kürzester Frist die erforderlichen Platten herzustellen, indem man 2%igen, Pepton enthaltenden Agar mit der Serumflüssigkeit zu gleichen Teilen mischt und in Platten ausgießt.

7. Nutroseserumnährboden, modifiziert nach Vannod.

Statt 15 cm^3 Serum mit $30\text{--}35\text{ cm}^3$ Wasser zu vermischen, werden 15 cm^3 Serum mit $40\text{--}50\text{ cm}^3$ Wasser gemischt. Zur Mischung werden nach Umschütteln 3 cm^3 Glycerin und 1 g Nutrose gegeben; alsdann wird das Ganze aufgekocht.

8. Eiereiweißnährboden nach Lipschütz.

In einem größeren Glaskolben wird eine 2%ige Lösung des Eiereiweißes in Leitungswasser bereitet, mit 20 cm^3 einer $\frac{n}{10}$ -Lauge pro 100 cm^3 der Lösung versetzt, $\frac{1}{2}$ Stunde stehen gelassen und während dieser Zeit einigemale tüchtig geschüttelt. Alsdann wird durch ein Faltenfilter filtriert, in Erlenmeyerkolben in Mengen von $30\text{--}50\text{ cm}^3$ abgefüllt und durch eine 2—3mal über der Asbestplatte an demselben Tage oder an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vorgenommene und bis zum Sieden fortgesetzte Erhitzung sterilisiert. Die Eiereiweißlösung kann auch im strömenden Dampf sterilisiert werden. Diese Lösung kann bereits als flüssiges Nährmedium für Gonokokken dienen oder wird im Verhältnis 1 : 2 oder 3 mit Agar zu einem festen Nährboden verarbeitet. Der Nährboden ist klar und durchsichtig.

9. Milchserumnährboden nach Piorkowski.

1 l Milch wird mit 5 cm^3 verdünnter Salzsäure (1 : 4) versetzt und bei 37° aufbewahrt, bis das Casein ausgefallen ist (16—20 Stunden); statt dessen kann die Milch auch gekocht werden. Dann wird filtriert und das Filtrat mit 10%iger Sodalösung neutralisiert. Darauf wird 2 Stunden im Dampftopf gekocht, die Neutralisation wieder von neuem vorgenommen und abermals filtriert. Der Nährboden wird nunmehr in Kolben oder Reagensgläser gefüllt und eine Stunde bei 100° sterilisiert. Dieser Nährboden kann in flüssigem Zustande, mit gleichen

Teilen Bouillon versetzt, oder in fester Form, im Verhältnis von 1 Teil mit 2 Teilen 3%igem Agar gemischt, verwendet werden.

10. Milchserumnährboden nach *Sabouraud* und *Noiré*.

1 l Milch 5 Minuten kochen, Casein mit 2 cm³ Salzsäure fällen, Milchserum abfiltrieren, mit der Hälfte Wasser verdünnen, mit 10%iger Sodalösung neutralisieren, 10 Minuten bei 120° sterilisieren, filtrieren und im Autoklaven hinzusetzen: Pepton 1%, Glucose oder Saccharose 1%, Harnstoff 0·3%, Agar 1·6%, filtrieren und nochmals in Röhren bei 110° sterilisieren.

11. Serum Nährboden nach *Ungermann* (s. S. 575).

Vornehmlich für Dauerkulturen geeignet.

X. Spezialnährböden für Pneumokokken.

1. Alkalische Serumbouillon nach *Neufeld* und *Haendel*.

Alkalische Bouillon wird mit 5—10% Rinder Serum versetzt. Statt des Rinder Serums kann auch anderes Serum oder menschliche Ascitesflüssigkeit — je nach dem Eiweißgehalt in entsprechender Menge — genommen werden. Der Nährboden ist insbesondere gut geeignet zur Erhaltung der Virulenz der Pneumokokken.

2. Erstarrtes Serum (empfohlen von *Fränkel*).

Herstellung s. S. 576.

3. *Pfeifferscher* Blutagar (empfohlen von *Fränkel* und *Reich*).

Herstellung s. S. 615.

4. Blutagar.

1 Teil defibriniertes Blut wird mit 9 Teilen verflüssigtem und auf 45° abgekühltem Agar vermischt.

5. Serumagar nach *Weichselbaum*.

1 Teil Serum + 2 Teile Agar.

6. Eiernährboden nach *Oberstadt* (s. S. 581).

7. Serum nach *Ungermann*.

Vornehmlich für Dauerkulturen.

XI. Spezialnährböden für Anaerobier.

1. Gewöhnliche Nährböden mit Zusatz von Reduktionsmitteln.

Gewisse reduzierende Substanzen fördern das Wachstum der Anaerobier und sind in manchen Fällen unentbehrlich. *Liborius* stellte fest, daß ein Zusatz von 2% Traubenzucker das Wachstum beschleunigt, während *Smith* angibt, daß ein Zuckerzusatz in der angegebenen Höhe häufig das Wachstum schädigt oder hemmt (s. S. 569). Es ist daher zweckmäßig, nur einen Zusatz von 0·3—0·5% Traubenzucker zu wählen. Besonders gute Wachstumserfolge sahen *de Gasperi* und *Savini* bei Zusatz eines Gemisches von je 0·4% Trauben- und Milchzucker. *Kitasato* und

Weyl hat sich bei der Züchtung von Tetanus-, Rauschbrand- und malignen Ödembacillen ein Zusatz von 0·3—0·5% ameisensaurem Natron oder 0·1% indigschwefelsaurem Natron, insbesondere zu Nähragar, als brauchbar erwiesen.

2. Gewöhnliche Nährböden mit Zusatz von Gewebsstücken nach *Tarozzi*.

Zu gewöhnlicher peptonisierter Bouillon oder zu gewöhnlichem Nähragar setzt man frisch und aseptisch entnommene Gewebsstücke. Das Gewebe kann aus irgend einem der üblichen Versuchstiere (Meerschweinchen, Kaninchen, weiße Maus) entnommen werden, unter der Bedingung, daß das Tier gesund ist. Nicht alle tierischen Gewebe leisten gleich gute Dienste; am besten erweisen sich die parenchymatösen Organe (Leber, Milz, Hirn), dann die Lymphknoten und zuletzt die Muskelgewebe. Um vor Verunreinigung sicher zu sein, setzt man die mit Gewebe versehenen Nährbodenröhrchen auf 1—2 Tage in den Brutschrank von 37° und beimpft sie alsdann. Die Entnahme der Gewebstücke erfolgt in der Weise, daß das Tier getötet wird, und daß nach aseptischer Eröffnung der Bauchhöhle mit steriler Schere ca. 1 cm³ große Organstücke entnommen werden.

Die Brauchbarkeit derartiger Nährböden wird, wie *Wrzosek* nachweisen konnte, durch Sterilisieren nicht beeinträchtigt, jedoch dürfen Temperaturen von 100° hierbei nicht überschritten werden (*Harrass*).

3. Leberbouillon mit Leberbrei oder Gehirnbouillon mit Gehirnbrei nach *Harrass*.

1 Pfund frische Kalbsleber oder frisches Kalbsgehirn wird in der Fleischmaschine zerkleinert, mit 1 l Leitungswasser übergossen, neutralisiert und das gut durchgeschüttelte Gemisch auf Erlenmeyerkölbchen verteilt. Zu dem Gemisch kann Pepton oder Traubenzucker zugesetzt werden. Darauf wird 1½—2 Stunden im strömenden Dampf sterilisiert. Vor dem Gebrauch füllt man 10 cm³ Flüssigkeit nebst Organbrei in sterile Reagensgläser. Auch die Flüssigkeit über dem Organbrei kann als Nährboden für Anaerobier Verwendung finden; allerdings soll dann das Wachstum wesentlich geringer sein.

4. Leberbouillon nach *Pfuhl*.

0·5 kg Rinderleber, die in einer Fleischmaschine zerkleinert worden ist, wird mit 1 l Wasser vermischt und dann 1—2 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Hierauf wird das Gemisch in der für Nährbouillon üblichen Weise unter Zusatz von Pepton und Kochsalz fertiggestellt. Abfüllen in Röhrchen und Aufbewahrung wie Nährbouillon.

5. Leber-Leberbouillon nach *Würcker* in der Vorschrift von *Heim*.

Leber vom Rinde oder Pferde oder von einem anderen Tiere wird im ganzen mit der doppelten Gewichtsmenge Wasser gekocht, zum abgekochten Wasser 1% Pepton und 0·5% Kochsalz gegeben, die so angesetzte Bouillon mit Natronlauge bis zum Phenolphthaleinpunkt (oder

darüber) versetzt, gedämpft, filtriert, mit 2% Traubenzucker versetzt und nochmals filtriert.

Die gekochte Leber selbst wird in Stücke von 1—2 cm^3 geschnitten, die für sich in einem Kölbchen sterilisiert aufbewahrt werden. Zum Gebrauch werden in je ein Reagensröhrchen 3—5 solche Leberstückchen gegeben, so daß sie dann 4 cm hoch stehen; dann wird so viel Leberbouillon darüber gefüllt, daß die gesamte Schicht 7—8 cm hoch ist. Diese Röhrchen werden $\frac{3}{4}$ Stunden gedämpft und sind dann zur Verwendung fertig. Haben sie einige Zeit gestanden, so müssen sie ins siedende Wasser gestellt werden, um den eingedrungenen Luftsauerstoff zu entfernen. Nach der Impfung wird sterilisiertes Paraffinum liquidum in etwa 2 cm hoher Schicht aufgegeben.

6. Hirnbrei nach E. v. Hibler.

Hirn wird in der Hackmaschine zerkleinert, mit $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ Raumteil Wasser oder 0.6% iger Kochsalzlösung vermischt und $\frac{1}{2}$ —1 Stunde gekocht, um die Luft auszutreiben. Unmittelbar darauf wird entweder in Reagentgläser 5—10 cm hoch mit einer Kugelpipette eingefüllt oder in Erlenmeyerkölbchen bis zu $\frac{3}{4}$ ihres Fassungsraumes in der Weise, daß die Mündung in den Brei eintaucht, während die Luft aus dem Kolbenraum mittels Glashebers ausgesaugt wird.

7. Weitere Spezialnährböden s. in dem Abschnitt: Spezialnährböden für Spirochäten (S. 623).

XII. Spezialnährböden für pathogene Pilze.

1. Nährboden nach Sabouraud (Milieu d'épreuve).

Agar wird mit gewöhnlichem Wasser übergossen und $\frac{1}{2}$ Stunde quellen gelassen. In ein anderes Gefäß gibt man Maltose (Maltose brute von Charnit) und granuliertes Pepton (von Chassaing) und löst beides in gelinder Wärme. Dann gießt man den gequollenen Agar dazu und so viel destilliertes Wasser, daß man folgende Verhältnisse bekommt: Agar 100, Pepton, Maltose 4, Agar 18.

Man stellt nun den Kolben mit diesem Gemisch in den Autoklaven und schließt den Deckel erst dann hermetisch, wenn Dampf Bildung erfolgt. Man läßt die Temperatur bis auf 120° steigen, schließt das Gas und öffnet den Deckel erst dann, wenn die Temperatur bis auf 100° gefallen ist. Hierauf wird durch Chardinpapier in weite Kolben filtriert und ersetzt das Filter sofort, wenn die Flüssigkeit langsam zu tropfen beginnt. Nach Beendigung der Filtration werden alle Kolben in einen großen zusammengegossen, damit alles gut durcheinanderkommt. Eine Neutralisation findet nicht statt. Hierauf wird in kleine Kölbchen abgefüllt, die nochmals im Autoklaven sterilisiert werden.

Sabouraud empfiehlt diesen Nährboden zur Gewinnung von Ausgangskulturen, nach Plaut ist er hierzu jedoch wenig geeignet.

2. Nährböden nach *Plaut* für Ausgangskulturen.

Pepton 1—2·0, Traubenzucker 1·0, Glycerin 0·5, Agar 2·0, Kochsalz 0·5, Wasser 100 oder Wasseragar ohne Zusatz. Eine Neutralisation dieses Nährbodens findet nicht statt.

3. Nährboden nach *Sabouraud* (*Milieu de choix*).

Pepton 1—2·0, Glykose 3—4, Agar 1·5—2·0, Aqua 100·0.

4. Nährboden nach *Sabouraud* zur Fortzüchtung (*Milieu de conservation*).

Pepton 3·0, Agar 1·8, Wasser 100·0.

XIII. Spezialnährböden für *Spirochäten*.

1. Serum nach *Ungermann* (zur Züchtung der *Sp. icterogenes*, der *Sp. gallinarum*, der *Sp. obermeieri* und der *Sp. duttoni*).

Steriles, frisch gewonnenes Serum wird unverdünnt oder in Verdünnungen mit geringen Mengen physiologischer Kochsalzlösung oder *Ringerscher* Flüssigkeit in geeigneten Kulturröhrchen — Gläschen von 5 cm Länge und 0·9 cm lichter Weite sind für die einfache Fortpflanzung vorteilhaft — 30 Minuten auf 58—60° erhitzt, dann zum Luftabschluß sogleich mit sterilem Paraffinöl überschichtet und nach genügender Abkühlung beimpft. Am besten bewährt sich aus technischen Gründen und in seiner Eigenschaft als Nährboden Kaninchenserum. Besonders gleichmäßige und sichere Resultate ergibt Serum, das von möglichst jungen Tieren gewonnen wird.

2. Pferdeserum nach *Schereschewsky* (zur Züchtung der *Sp. pallida*).

Normales, steriles Pferdeserum wird in dünnwandige, sterile Röhrchen, die etwa 10—15 cm lang sind, an der Wand langsam eingegossen, um von vornherein eine Luftbeimengung zu vermeiden. Die durch Kork oder Watte und Gummikappe verschlossenen Röhrchen kommen für eine Stunde ins Wasserbad bei 57—58°, wonach die Temperatur allmählich bis auf 70° gebracht wird. Es ist darauf zu achten, daß die Temperatursteigerung nicht zu stürmisch verläuft, und daß die Wasserhöhe den Serumrand im Röhrchen überragt. Sobald eine Koagulation eingetreten ist, d. h. das Serum zu einer unbeweglichen Masse erstarrt ist, werden die Nährböden über Nacht bei 37° auf Sterilität geprüft. Es ist gut, das Serum nur so lange zu erhitzen, als es noch durchsichtig ist.

Die von *Mühlens* angegebene Herstellungsart dieses Nährbodens lautet folgendermaßen: Pferdeblut wird in sterilen 1—2 Litergefäßen steril aufgefangen. Am nächsten Tage wird das ausgeschiedene klare, bernsteingelbe Serum mit sterilen Pipetten abgenommen, in weite Reagensgläser oder Erlenmeyerkölbchen gefüllt und dann an je drei aufeinanderfolgenden Tagen 1½ Stunden lang in den 58°-Schrank gestellt, um das Serum zu inaktivieren und auch Sicherheit der Keimfreiheit zu erzielen. Dann wird in kleine, etwa 8 cm hohe, 1 cm weite

Reagensröhrchen zu zwei Drittel Serum gefüllt und mit vorher im Dampf sterilisierten Korken verschlossen. In den 58—60° zeigenden Schrank gestellt, erstarrt das Serum innerhalb von 7—10 Stunden zu der gewünschte Konsistenz derart, daß das dicke, gallertige Serum noch deutlich durchsichtig bleibt. Vor dem Gebrauch werden die Röhrchen noch drei Tage lang bei 37° aufbewahrt.

Sowade benutzte mit Erfolg den Originalnährboden nach *Schere-schewsky*.

3. *Pferdeserum* nach *Shmamine* (zur Züchtung der *Sp. pallida*).

In 200 cm^3 *Pferdeserum* werden unter Umrühren 1—1.5 g ameisen-saures oder noch besser nucleinsaures Natron gelöst. Durch Einleiten von Kohlensäure während 2—3 Minuten mittels des *Kippschen* Apparates wird die Lösung zunächst klarer gemacht, das Serum hierauf in hoher Schicht in Reagensgläser gefüllt, 3 Tage je 1 Stunde auf 60° erhitzt und am vierten Tage langsam auf 70° gebracht. Die Erstarrung des Serums wird dabei unter fortgesetzter genauer Beobachtung zu verschiedenen Zeiten unterbrochen, so daß Nährböden von weicher, mittelharter und harter Konsistenz erhalten werden. Die beiden letzteren dienen zur Gewinnung der ersten Generation aus dem Ursprungsmaterial, der weiche Nährboden zur späteren Isolierung der Reinkultur.

4. *Serum* nach *Proca*, *Danila* und *Stroe* (zur Züchtung der *Sp. pallida*).

a) Zu 10 cm^3 Serum vom Pferde oder Kalb (fraktioniert sterilisiert) wird 1 cm^3 Pyrogalluslösung (1 cm^3 Acid. pyrogall., 2 g NaOH, 100 cm^3 Aqua dest.) hinzugefügt; Koagulation bei 80°. Zusatz von Formol 1 : 1000 soll andere Bakterien zurückhalten, ohne das Wachstum der Spirochäten zu hindern.

b) Serum vom Pferde oder Kalb (fraktioniert sterilisiert) und Gentianaviolettlösung (0.1 g Gentianaviolett : 300 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung) werden zu gleichen Teilen gemischt; Koagulation bei 80°.

5. *Serum agar* nach *Mühlens* (zur Züchtung der *Sp. pallida*).

2 Teile neutraler Agar und 1 Teil inaktiviertes klares, steriles *Pferdeserum* werden, 45° warm, in Reagensgläsern gemischt. In den noch flüssigen Nährboden wird mit einer langen Nadel eine Öse des Ausgangsmaterials eingebracht und nach kräftigem Schütteln des Platindrahtes mit der gleichen Öse noch die Impfung mehrerer anderer Röhrchen vorgenommen. Die Röhrchen werden alsdann schnell zum Erstarren gebracht und hierauf im Brutschrank gehalten.

W. Hoffmann bezeichnet den Serumagar nach *Mühlens* als den brauchbarsten Nährboden für die Züchtung der *Sp. pallida*. Auch *Arnheim* benutzte mit Erfolg diesen Nährboden.

6. *Serum bouillon* nach *Mühlens* (zur Züchtung der *Sp. pallida*).

Pferdeserum wird nach *Mühlens* (s. oben) erstarrt, alsdann wird es mit sterilem Platindraht zu feinen Klümpchen zerteilt; hierauf

werden die Röhrchen zu drei Viertel mit Serumbouillon (1 Teil Serum zu 2 Teilen Bouillon) oder Bouillon aufgefüllt. Die Röhrchen kommen auf 1 Stunde zur Sauerstoffentfernung bei 60°.

7. *Ascitesagar* nach *Noguchi* (zur Züchtung der *Sp. pallida* aus menschlichem Material, sowie der *Sp. obermeieri*, der *Sp. gallinarum* und der *Sp. icterogenes* (*Uhlenhuth* und *Fromme*) s. *icterohaemorrhagiae* (*Inada*).

2 Teile schwach alkalischer 2%iger Agar und 1 Teil Ascites- oder Hydrocelenflüssigkeit werden gemischt. Der Nährboden wird in Mengen von 15 cm³ in Reagensgläser gefüllt, jedes Röhrchen außerdem mit einem Stückchen sterilen frischen Kaninchenagars (Niere oder Hoden) beschickt und nach oben mit einer ca. 3 cm hohen Schicht von flüssigem Paraffin überschichtet. Nicht jede Ascitesflüssigkeit ist brauchbar; insbesondere darf sie keine Galle enthalten, ferner muß sie in dem Kulturröhrchen bei der Erhitzung ein feines Fibrinnetz ausscheiden.

8. *Kaninchenserumwasser* nach *Noguchi* (zur Züchtung der *Sp. pallida* aus Kaninchenmaterial).

1 Teil Kaninchenserum wird mit 3 Teilen destilliertem Wasser gemischt und der Mischung frisches Kaninchengewebe (Niere oder Hoden) zugesetzt. Das Serumwasser wird mit einer 3 cm hohen Schicht von Paraffinöl überschichtet.

9. *Pferdeserumwasser* nach *Hata* (zur Züchtung der *Sp. obermeieri*).

Frisch abgesetztes Serum eines gesunden Pferdes wird zu je 4 cm³ mit einer sterilen Pipette in 15—17 mm weite Reagensgläser gefüllt, 8 cm³ physiologischer Kochsalzlösung werden zugegeben und mit dem Serum gleichmäßig vermischt. Die Röhrchen werden alsdann in einem Wasserbade von 58° etwa 3 Stunden gehalten; innerhalb dieser Zeit läßt man die Temperatur langsam auf 70—71° ansteigen und hält die Röhrchen alsdann noch 1/2 Stunde bei 71°. In das halbstarre Serum werden, nachdem es abgekühlt ist, kleine Stückchen Kaninchenniere versenkt; das spirochätenhaltige Blut wird in die Tiefe eingesät. Die Kaninchenniere kann auch durch 2—3 Stücke sog. Speckhaut von 1 cm³ Größe ersetzt werden, die vom Pferdeblutkuchen unter aseptischen Kautelen gewonnen wird.

10. *Kaninchenserumwasser* nach *Uhlenhuth* (zur Züchtung der *Sp. icterogenes*).

Das zur Gewinnung von Serum erforderliche Kaninchenblut wird durch Herzpunktion gewonnen. Das Blut bleibt zweckmäßig im sterilen Zentrifugengläse über Nacht stehen, damit das Serum sich gut absetzt. Das zur Verwendung kommende Leitungswasser wird in säurefrei gereinigten Reagensgläsern in den gewünschten Mengen im Autoklaven sterilisiert, ebenso das zur Überschichtung der Kultur dienende Paraffinöl.

Serum und Leitungswasser werden im Verhältnis 1 : 30 gemischt, d. h. zu 3 cm³ Leitungswasser in einem Reagensglase wird kurz vor der

Beimpfung 0.1 cm^3 Kaninchenserum zugesetzt. Nach der Beimpfung Überschichtung mit Paraffinöl. Die Überschichtung mit Paraffinöl kann auch fortfallen (*Uhlenhuth*).

Uhlenhuth hat auch das Serum und Blut infizierter Tiere und Menschen direkt zur Kultur der in ihm vorhandenen Spirochäten in Leitungswasser verwendet.

Manteufel empfiehlt Mischung des Serums und Leitungswassers im Verhältnis 1 : 10. Er setzt zu 2 cm^3 Leitungswasser in einem *Uhlenhuth*-Röhrchen 4 Tropfen Kaninchenserum und hält das Gemisch eine Stunde bei 58° . Alsdann erfolgt Beimpfung und Paraffinverschuß.

11. Leitungswasser nach *Manteufel* (zur Züchtung der *Sp. icterogenes* und der *Sp. hebdomadis* aus Blut).

Nach dem Vorgange von *Gildemeister* für die Typhusbacillen-Blutkultur wird zu $8\text{--}10\text{ cm}^3$ steriles Leitungswasser oder doppelt destilliertes steriles „Ampullenwasser“ $2\text{--}3\text{ cm}^3$ des zu untersuchenden Blutes zugesetzt.

Manteufel hat das Kulturverfahren mit Erfolg bei der *Sp. icterogenes* angewendet. Nach *Beger* eignet sich das Verfahren auch zur Züchtung der *Sp. hebdomadis* aus Blut.

XIV. Spezialnährböden für Amöben.

1. Strohinfuse oder -Abkochungen. — 2. Fucusnährboden nach *Celli* und *Fiocca*: 5 Teile Fucus (*Chondrus crispus*), 100 Teile Wasser (mit oder ohne Bouillonzusatz). Das Gemisch wird stark alkalisch gemacht: 1 cm^3 $\frac{n}{10}$ -Kalilauge oder $4\text{--}5\text{ cm}^3$ gesättigte Sodaauslösung auf 10 cm^3 des Nährbodens. — 3. Gelatine nach *Mouton*. 10 oder 20 g Gelatine, 100 cm^3 gewöhnlicher Nährbouillon, 900 cm^3 Wasser, schwacher Alkalizusatz. — 4. Agar nach *Beijerinck*. Gewöhnlicher Agar wird wiederholt ausgewaschen, um die löslichen organischen Substanzen aus demselben zu entfernen; alsdann Zusatz von 0.5% von einem Phosphorsalz und 0.05% Chlorcalcium. — 5. Agar nach *Schar- dinger*. 30 g Heu werden in 1 l Wasser suspendiert. Nach Zusatz von $1\text{--}1.5\text{ g}$ gepulvertem Kalkhydrat wird die Mischung 24–36 Stunden in den Brutofen gestellt, filtriert, durch Phosphorsäure ausgefällt und alkalisiert. Hierauf Zusatz von $1\text{--}2\frac{1}{2}\%$ Agar. Übertragung des Materials in das Kondenswasser. — 6. Agar nach *Frosch*. 0.5 g Agar, 90 cm^3 Leitungswasser, 10 cm^3 schwach alkalische Nährbouillon. — 7. Agar nach *Musgrave* und *Clegg*. 20 g Agar, 1000 cm^3 destilliertes Wasser, $0.3\text{--}0.5$ Fleischextrakt, $0.3\text{--}0.5$ Kochsalz. Alkaliüberschuß mit Phenolphthalein bestimmt.

XV. Spezialnährböden für Leishmanien.

1. Nährboden von *Mc Neal* und *Novy*. Der Nährboden besteht aus einer Mischung von Agar und Tierblut, u. zw. erwies sich als fast

ausschließlich brauchbar das Kaninchenblut. Die Ursache scheint darin zu liegen, daß das Hämoglobin dieses Blutes nicht so leicht zersetzt wird wie das anderer Tierarten. Das Wachstum findet vornehmlich in dem Kondenswasser statt, späterhin auch auf der Agaroberfläche. Ursprünglich setzten *Mc Neal* und *Novy* einen Teil defibriertes Blut zu 5 Teilen Agar zu, später fanden sie 2 Teile Blut zu 1 Teil Agar als die beste Mischung; aber auch bei einfachem Zusetzen von defibriertem Kaninchenblut zum Kondenswasser wird Wachstum erzielt. *Martin Mayer* empfiehlt, gleiche Teile Agar und Blut zu nehmen. — 2. NNN-Agar nach *Nicolle*. Der NNN-Agar, wie er in der Literatur allgemein genannt wird, stellt eine Vereinfachung des Blutagars von *Mc Neal* und *Novy* dar. 900 g destilliertes Wasser, 14·0 g Agar-Agar, 6·0 g NaCl. Dazu wird bei einer Temperatur von ca. 43° defibriertes Kaninchenblut im Verhältnis von 1 : 2 gesetzt. *de Cristina* und *Connata* empfehlen, statt Kaninchenblut Hundeblut zu verwenden. — 3. Flüssiger Nährboden für Massenkulturen nach *Laveran* und *Pettit*. Pepton Chapoteaux 2·0, NaCl 6·0, Aqua dest. 900·0. Dieses Peptonwasser wird zu gleichen Teilen mit defibriertem Kaninchenblut gemischt.

XVI. Spezialnährböden zur Züchtung von Flagellaten.

1. Blutagar nach *W. Nöller*. Für den Blutagar in Röhren ergab folgender Agar die besten Ergebnisse: Agar 25·0, Traubenzucker 20·0, schwach alkalische Pferdefleisch-Nährbouillon 1000·0. Dieser Agar, der in der gebräuchlichen Weise hergestellt und filtriert wird, wird in Röhren zu etwa 3—5 cm³ eingefüllt und aufbewahrt. Beim Herstellen des Blutagars werden die Röhren im Dampftopfe oder in kochendem Wasser verflüssigt, mit dem gleichen bis doppelten Volumen defibrierten Pferdeblutes versehen, schräg erstarren gelassen, dann mit Gummistopfen verschlossen, die über den etwas in das Röhren hineingeschobenen Wattepfropfen aufgesetzt werden. Beim Mischen des Blutes ist besonders darauf zu achten, daß der Agar möglichst heiß (direkt nach dem Herauskommen aus dem Dampftopfe oder aus dem kochenden Wasser) mit dem Blute gemischt wird, weil dadurch die Herstellung steriler Röhren erleichtert und die Güte des Nährbodens verbessert wird. Die gut schräg erstarrten und mit Gummistopfen versehenen Röhren werden über Nacht oder 48 Stunden in einen 30°-Brutschrank zur Kondenswasserabscheidung und zur Prüfung auf Sterilität aufrecht eingestellt, darnach bis zur weiteren Verwendung im Eisschranke aufbewahrt. Die Herstellung von Blutagarplatten geschieht nach folgendem Rezept: Agar 10·0, Traubenzucker 10·0, schwach alkalische Pferdefleisch-Nährbouillon 1000·0. Der Agar ist stets nur in geringen Mengen (etwa 1 l) herzustellen, damit er vor dem Verflüssigen oder Filtrieren nicht allzulange der Hitze des Dampftopfes ausgesetzt wird. Als Agar wurde Fadenagar benutzt,

der ungewaschen zur Verwendung gelangte. Der in der Bouillon mit dem Traubenzucker im Dampftopfe aufgelöste Agar wurde stets nur so lange im Dampfe belassen, bis eine vollständige Lösung eingetreten war, dann über Nacht stehen gelassen. Ein Klären mit Eiweiß hat sich nicht bewährt. Der am anderen Tage wieder durch Erhitzen im Dampftopfe verflüssigte Agar wird durch Watte filtriert und sofort in Röhrrchen hoch aufgefüllt so daß jedes Röhrrchen etwa $12-18\text{ cm}^3$ Agar enthält. Diese Röhrrchen werden nach Einfüllen des Agars noch zweimal an aufeinanderfolgenden Tagen je 45 Minuten im Dampftopfe sterilisiert und dann zur Verwendung aufbewahrt. Als Platten werden Petrischalen benutzt, deren Unterschale einen Durchmesser von etwa $9-10\text{ cm}$ besitzt und deren Höhe nicht unter 2 cm , am besten noch etwas mehr, beträgt. Bei der Herstellung des Blutagars wird der im kochenden Wasser gut verflüssigte Agar in ein steriles Mischkölbchen aus dem Röhrrchen gegossen und hierzu die gleiche Menge gut defibriniertes, flockenloses Pferdeblut gegeben. Der Agar ist möglichst heiß mit dem Blute zu mischen! Nach erfolgter Mischung werden Platten gegossen, die zur Erstarrung sofort in den gut gekühlten Eisschrank zu stellen sind und am besten sofort nach dem Erstarren beimpft werden. Eine Verwendung der Platte ist wegen ihres Kondenswassergehaltes nur im umgedrehten Zustande möglich. Das Kondenswasser kann dann an den Seiten der umgedrehten Bodenschale herabfließen, wo es in der Deckelschale durch Einfließen in eine $2-3\%$ ige Sublimatlösung aufgefangen wird. Die Sublimatlösung ist möglichst täglich zu erneuern. — 2. Blutagar nach *Mc Neal-Novy* (s. S. 626). Wachstum nur im Kondenswasser.

XVII. Spezialnährböden für Wasseruntersuchungen.

1. Gelatine nach amtlicher Vorschrift.

1 g *Liebigs* Fleischextrakt, 1 g Pepton und 0.5 g NaCl werden in 100 g Wasser gelöst, $\frac{1}{2}$ Stunde im Dampf gekocht und nach Erkalten und Absetzen filtriert. Zu 900 g dieser Lösung werden 100 g Gelatine hinzugefügt und nach Quellen oder Weichen der Gelatine bis höchstens $\frac{1}{2}$ Stunde im Dampf gekocht. Der heißen Lösung fügt man zuerst größere Mengen, dann tropfenweise 4%ige Natronlauge hinzu, bis blaues Lackmuspapier nicht mehr gerötet wird. Hierauf wird das Gemisch $\frac{1}{4}$ Stunde im Dampf erhitzt, die Reaktion geprüft und, wenn nötig, korrigiert. Hierauf fügt man 1.5 g krystallisierte, nicht verwitterte Soda hinzu, kocht $\frac{1}{2}-\frac{3}{4}$ Stunden im Wasser, filtriert und füllt in sterile Röhrrchen ab, die einmal im Dampf für 15—20 Minuten sterilisiert werden.

2. Hochprozentige Gelatine nach *Bürger*.

Die Herstellung hochprozentiger Gelatinenährböden verfolgt den Zweck, vereinzelte Keime in größeren Flüssigkeitsmengen direkt

zahlenmäßig nachzuweisen. Statt der 10%igen Gelatine wird eine 20- bis 25%ige Gelatine hergestellt. Zugleich mit dem Rohgelatinegehalt werden auch alle anderen Zusätze entsprechend erhöht. Beim Gebrauch wird die Gelatine durch Zusatz der zu untersuchenden Flüssigkeit auf 10% Gelatinegehalt verdünnt.

3. Milchzucker - Fuchsin - Natriumsulfit - Gelatine nach *Bürger*.

Sie wird analog dem *Endo*-Agar hergestellt, u. zw. mit 10% Gelatinegehalt und auch mit 20% bzw. 25% Gehalt. Der Nährboden eignet sich zum zahlenmäßigen Nachweis von *B. coli* in Flüssigkeiten, aber nicht zum Nachweis von Typhusbacillen, da diese den Nährboden gleichfalls röten und Fuchsinglanz hervorrufen.

Anhang.

Regenerierung von Agar.

Bis zum Ausbruch des Krieges war es üblich, zur Bakterienzüchtung verwendete Nährböden nach einmaligem Gebrauche zu vernichten und zu neuen Untersuchungen stets neue, bisher noch nicht gebrauchte Nährböden zu benutzen. Der durch die vermehrte Untersuchungstätigkeit und die Impfstoffbereitung während des Krieges außerordentlich gesteigerte Bedarf an Nährböden und die immer mehr und mehr zur Neige gehenden Vorräte an Agar zwangen uns jedoch, von dieser Regel abzuweichen und bereits gebrauchte Nährböden, nachdem sie eine entsprechende Umarbeitung, Regenerierung erfahren hatten, erneut zu verwenden. Insbesondere wurde dies bei den für den Nachweis von Typhus- und Ruhrbacillen benötigten Spezialnährböden, deren Verbrauch ungeahnte Dimensionen angenommen hatte, der Fall, so daß die von verschiedenen Seiten angegebenen Verfahren sich ausschließlich oder vornehmlich mit der Regenerierung dieser Spezialnährböden befassen. Wenn auch nach Beendigung des Krieges ein Agarmangel in Deutschland nicht mehr besteht und die Notwendigkeit, regenerierte Nährböden zu verwenden, nicht mehr vorliegt, so beanspruchen die in der Kriegszeit angegebenen Regenerierungsverfahren unser Interesse in dem Maße, daß es berechtigt erscheint, ihnen hier eine ausführlichere Besprechung zuteil werden zu lassen.

Bei der Wiedergewinnung von Agar aus gebrauchten Nährböden sind folgende Gesichtspunkte zu berücksichtigen (*Zeißler* und *Gaßner*). Handelt es sich um gewöhnlichen Nähragar, der regeneriert werden soll, so muß durch das anzuwendende Verfahren erreicht werden, 1. daß die dem Nährboden noch anhaftenden Bakterien entfernt werden, 2. daß die von den Bakterien gebildeten Stoffwechselprodukte eliminiert werden, und 3. daß die verbrauchten oder beim Regenerierungsprozeß umgesetzten oder verloren gegangenen Nährsubstanzen (Eiweißstoffe, Kohle-

hydrate und Salze) ersetzt werden. Handelt es sich um Spezialnährböden für die Typhus- und Ruhruntersuchungen, so muß das Verfahren außerdem berücksichtigen, daß 4. die dem Nährboden zugesetzten besonders Nährstoffe (Milchzucker), 5. die elektiv wirkenden Mittel (Krystallviolett, Malachitgrün, Metachromgelb), 6. die im Nährboden enthaltenen Indicatoren (Lackmuslösung, Fuchsin, Natriumsulfit, Kongorot, Wasserblau u. s. w.) so weit entfernt werden, daß etwaige Reste derselben oder ihre Zersetzungsprodukte bzw. ihre Umsetzungen weder das Wachstum der Keime auf dem regenerierten Nährboden beeinträchtigen, noch das diagnostische Bild stören. Schließlich muß darauf geachtet werden, daß die Erstarrungsfähigkeit der Agarsubstanz nicht leidet.

Diesen Grundgedanken tragen die nachstehend aufgeführten Verfahren im wesentlichen Rechnung.

1. Regenerierung von *Endo*-Agar nach *Mohorčič*.

Die gebrauchten Platten des *Endo*-Agars werden im Dampftopf sterilisiert; der rote Agar wird in einer Glaswanne zum Erstarren gebracht und alsdann in kleine Stücke zerhackt. Je sorgfältiger dieses Zerhacken ausgeführt wird, desto rascher ist die nun folgende Operation beendet. Die zerhackten, roten Agarstückchen kommen in etwa 6 l fassende Flaschen, u. zw. so, daß in jede Flasche etwa das Quantum von 4 l Agar gebracht wird. Die Flaschen werden mit einem gut schließenden Kork verschlossen, dessen Mantel mit ein paar zahnradartigen Vertiefungen versehen wird. Durch den durchlochten Kork führt eine Glasröhre bis fast auf den Boden der Flasche herab. Der aus dem Kork ragende Teil der Glasröhre wird mit der Wasserleitung mittels eines Kautschukschlauches verbunden. Nun kann Wasser in die Flasche eingeleitet werden, das die Agarstückchen in Bewegung setzt und auslaugt. Durch die Kerben des Korkes fließt in Parabeln ein stark fuchsinrot gefärbtes Wasser heraus, ohne daß Agarteilchen mitgerissen werden könnten. Es empfiehlt sich, die Sechsliterflasche in einen Eimer zu stellen. Dieses Auslaugen wird etwa 24 Stunden fortgesetzt. Am Schluß ist das abfließende Wasser farblos und die Agarteilchen sind sehr licht gefärbt, teilweise sogar farblos.

Die ausgelaugten Agarteilchen werden zur Entfernung des ihnen anhaftenden Wassers auf ein Sieb gebracht und dann in Emailtöpfen im siedenden Wasserbade zum Schmelzen erhitzt. Die rote Agarlösung wird nun in der Hitze mit Tierkohle entfärbt. Der Zusatz an Tierkohle erfolgt allmählich unter gutem Rühren. Über die Menge der Tierkohle, die dabei Verwendung findet, kann man nichts Bestimmtes angeben, denn die Menge richtet sich nach der Güte der Tierkohle und nach der Stärke der Fuchsinfärbung des Agars. Als Regel gelte: man setze so lange Tierkohle unter Umrühren zu, bis ein Tropfen des Agars farblos oder höchstens nur schwach rosa gefärbt ist. Statt der Tierkohle kann auch

das viel billigere Spodium verwendet werden. Die Masse bringt man dann zum Kochen. Nach dem Aufkochen kühlt man die Masse auf 50°, gibt zu jedem Topf das Eiklar von 2 Eiern, das man vorher mit etwas Wasser vermischt hat, rührt tüchtig um, so daß die Mischung vollständig wird. Hierauf stellt man den Topf in einen schon angeheizten Wasserdampfsterilisationsapparat. Nach einer Stunde löscht man die Flamme und läßt, ohne die Türe zu öffnen, den Apparat, am besten über Nacht, sich abkühlen.

In dem nun festgewordenen Agar befindet sich auf dem Boden des Topfes die gesamte Tierkohle, die durch das koagulierende Eiweiß mitgerissen wurde, als schwarze Schicht. Diese wird von der geklärten Agarmasse mit Leichtigkeit durch Abschneiden entfernt.

Um den Agargehalt der gekühlten Agarmasse rasch zu bestimmen, führt man eine Wasserbestimmung in etwa 0·5 g der verflüssigten und gut durchmischten Masse aus. Am besten wird die Bestimmung in einer Platinschale vorgenommen. Die Agarmasse wird auf dem Wasserbade in etwa 10 Minuten zum Trocknen gebracht. Aus dem Gewichte der Platinschale vor und nach dem Versuche ergibt sich der Agargehalt in der eingewogenen Agarmenge und durch Berechnung der Prozentgehalt. Um nun einen 3%igen Agar zu erzeugen, ermittelt man das Gewicht einer Porzellanschale, gibt den Agar hinein, wägt und rechnet aus der Differenz unter Zugrundelegung des Prozentgehaltes an Agar die Agarmenge aus, die in der Porzellanschale vorliegt. Aus der Agarmenge berechnet man die Menge Liter eines 3%igen Agars, die man aus der Agarmenge erzeugen kann.

Nun setzt man die dazugehörige Menge Fleischwasser, Pepton und Salz hinzu und dampft die Masse auf einem starken Wasserbade so lange ein, bis ihr Gewicht der Menge gleichkommt, die man aus der Agarmenge herstellen kann. Der 3%ige Agar wird sodann neutralisiert, in Flaschen eingefüllt und sterilisiert, oder aber nach der Neutralisation sofort zum Gießen der *Endo*-Platten verwendet.

Modifikation dieses Verfahrens nach *Serger*.

Die gebrauchten, aus der Petrischale gezogenen Agarplatten werden verflüssigt, mit 0·1% in wenig Wasser aufgelöstem Sublimat versetzt und noch 20 Minuten flüssig erhalten, dann 6—8% eines Entfärbungspulvers hinzugefügt, das aus 2 Teilen trockener Tierkohle und 1 Teil Infusorienerde besteht. Nun wird unter öfterem Schütteln 10 Minuten auf dem Dampfbad erhitzt und durch einen Dampftrichter filtriert. Das Filtrat läßt man erkalten, reibt den Kuchen durch ein Sieb von 0·5 cm Maschenweite, rührt mit der 10fachen Wassermenge an und läßt unter öfterem Umrühren 3 Stunden stehen. Das Wasser wird dann abgegossen, der Vorgang wird zweimal wiederholt und zum Schluß die Masse in Leinensäcke gegeben. Die Masse in den Leinensäcken berieselt man

20 Stunden mit kaltem Wasser und sammelt dann in ein Gefäß. Sie ist zur Weiterverarbeitung fertig.

Der wiedergewonnene Agar wird zweckmäßig alsbald zu Nährböden verarbeitet, u. zw. verwendet ihn *Serger* als Zusatz zu frischem Agarnährboden, indem er bei diesem die Zusätze an Pepton und Kochsalz verdoppelt. Frischer Agar und regenerierter Agar werden zu gleichen Teilen gemischt.

2. Regenerierung von *Endo*- und *Drigalski-Conradi*-Agar nach *Guth*.

Regenerierung von *Endo*-Agar. Die gebrauchten *Endo*-platten werden mit Hilfe eines Holzspatels aus den Glasschalen in ein weithalsiges Gefäß übergeführt und im Eisschrank aufbewahrt, bis sich ein größeres Quantum angesammelt hat. Ein mehr als 3—4tägiges Stehenlassen ist jedoch nicht ratsam, da die Schimmelbildung sonst zu weit fortschreitet. Ist ein längeres Aufbewahren nicht zu vermeiden, so wird der Agar inzwischen nochmals sterilisiert. Um den Nährboden wieder gebrauchsfähig zu machen, wird das Sammelgefäß 2 Stunden und länger, je nach der vorhandenen Agarmenge, im Dampftopf erhitzt, wobei sich der Bakterienrasen zum größten Teil am Boden absetzt, und der Agar durch Watte filtriert. Das Filtrat wird auf etwa 50° abgekühlt, mit Eiweiß durchgeschüttelt, nochmals etwa $\frac{1}{2}$ Stunde im Dampftopf erhitzt und abermals durch Watte gegossen. Man erhält so ein ganz klares Filtrat von saurer Reaktion. Die rote Färbung wirkt störend bei der Alkalisierung, diese läßt sich aber bei einiger Übung mit hinreichender Genauigkeit ohne Schwierigkeiten ausführen, indem man 100 cm³ des Agars in einem Glaskolben mit etwa 1 l siedend heißem destillierten Wasser verdünnt und $n/1$ -Sodalösung hinzugefügt, bis die Mischung auf Lackmuspapier in der Weise reagiert, daß sich das rote Lackmuspapier deutlich blau färbt, während das violette unverändert bleibt oder doch nur eine ganz leichte Blaufärbung annimmt. Meistens sind hierzu 1·5 bis 2·0 cm³ $n/1$ -Sodalösung erforderlich. Der Gesamtmenge des filtrierten Agars wird nun eine entsprechende Menge $n/1$ -Sodalösung, durchschnittlich also 15—20 cm³ pro Liter, zugesetzt und außerdem 10 g Milchzucker, 0·2 g Fuchsin, gelöst in 2 cm³ heißem Alkohol, und 2 g Natriumsulfit, gelöst in 20 cm³ Wasser. Das Ganze wird dann nochmals übersterilisiert.

Regenerierung von *Drigalski-Conradi*-Agar. Um gebrauchten *Drigalski-Conradi*-Agar wieder brauchbar zu machen, wird das in gleicher Weise wie beim *Endo*-Agar geklärte, saure Filtrat zunächst neutralisiert, u. zw. mit $n/1$ -Natronlauge. Die Einstellung auf den Neutralpunkt mittels Lackmuspapier macht hier keine Schwierigkeiten; eine Verdünnung mit Wasser ist hier nicht erforderlich. Dem neutralisierten Agar werden pro Liter 10 cm³ $n/1$ -Sodalösung, 10 g Milchzucker, 100 cm³ Lackmuslösung und außerdem 300 cm³ ungebrauchten *Drigalski*-

Agars hinzugefügt. Zuweilen ist es erforderlich, den letztgenannten Zusatz noch zu erhöhen; ob der Nährboden die erwünschte Konsistenz hat, muß durch Gießen einer Probeplatte festgestellt werden. Zu empfehlen ist es, nicht mehr als 2—3 l gleichzeitig in Arbeit zu nehmen und das Erhitzen nicht länger auszudehnen, als unbedingt nötig ist.

3. Regenerierung von Agar und *Drigalski-Conradi*-Agar nach *Baerthlein*.

Regenerierung von Nähragar. Man berechnet die ursprüngliche Menge der aufgesammelten zu regenerierenden Agarmasse, die infolge Austrocknung einen beträchtlichen Teil ihres Wassergehaltes verloren hat, nach der Zahl der abgeschabten Platten. So entsprechen z. B. 22—24 Agarplatten von 18 cm Durchmesser etwa 1 l frisch zubereiteten Nähragars. Dann wird der zu regenerierende Nährboden pro Liter mit je 500 cm³ destillierten Wassers versetzt und eingeschmolzen. Nach der Verflüssigung gibt man pro Liter des ursprünglichen Nährbodens 3 cm³ einer 10 %igen wasserfreien Sodalösung hinzu und kocht die Masse zunächst $\frac{1}{2}$ Stunde lang zwecks Sterilisierung. Darauf Zusatz von 20 g Tierkohle pro Liter Nährboden und nochmals $\frac{1}{2}$ Stunde kochen, wodurch die Sterilisierung vollendet wird und gleichzeitig teilweise Klärung der Agarmasse unter Adsorption der Bakterien seitens der Tierkohle erfolgt. Abkühlenlassen des Agars auf etwa 50—60° und Zusatz von 30 cm³ Rinderserum (an Stelle von Hühnereiweiß) auf je 1 l Nährboden zur weiteren Klärung. Anschließend einstündiges Kochen und Filtration des Agars im Dampftopf durch gewöhnliche Papierfilter. Während die Agarmasse durch das Filter läuft, werden pro Liter Nährboden je 6.5 g Pepton Witte und *Liebigs* Fleischextrakt in je 100 cm³ destillierten Wassers aufgelöst, gekocht und filtriert. Diese Nährlösung wird zu dem filtrierten Agar gegeben und nochmals kurz aufgekocht. Einstellung des Nährbodens auf den Lackmusneutralpunkt. Nach kurzer Sterilisierung ist der Nährboden gebrauchsfertig.

Statt der Nährlösung aus Pepton und *Liebigs* Fleischextrakt kann man ebensogut pro Liter des zu regenerierenden Nährbodens $\frac{1}{2}$ l gewöhnlicher Nährbouillon oder noch zweckmäßiger von *Hottinger*-Bouillon zusetzen. Bei Verwendung von Bouillon ist ein kurzes Eindampfen der Agarbouillonmasse erforderlich, um die gewünschte Konzentration und nötige Konsistenz des regenerierten Nährbodens zu erhalten.

Regenerierung von *Drigalski-Conradi*-Agar. Die ursprüngliche Menge der zu regenerierenden Nährbodenmasse wird ebenso wie beim gewöhnlichen Nähragar nach der Zahl der abgeschabten Platten in Litern abgeschätzt, pro Liter mit je 500 cm³ destillierten Wassers versetzt und verflüssigt. Nach dem Einschmelzen werden auf je 1 l Nährflüssigkeit 15 cm³ 10 %iger wasserfreier Sodalösung hinzugefügt

und wird der Nährboden durch $\frac{1}{2}$ stündiges Kochen sterilisiert. Anschließend werden auf je 1 l Nährflüssigkeit 20 g Tierkohle zugesetzt; die Mischung wird $\frac{1}{2}$ Stunde aufgekocht zwecks weiterer Sterilisierung und Klärung. Nach Abkühlung der Flüssigkeit auf etwa 50—60° gibt man zur weiteren Klärung pro Liter Nährboden 30 cm³ Rinderserum zu und läßt jene Mischung 1 Stunde lang kochen. Filtration im Dampftopf durch gewöhnliche Papierfilter. Inzwischen werden pro Liter Nährboden je 6·5 g Pepton Witte und *Liebigs* Fleischextrakt in je 100 cm³ destillierten Wassers aufgelöst, kurz aufgekocht und filtriert. Die Nährlösung wird alsdann zu dem filtrierten Agar zugesetzt. Somit entspricht die Regenerierung des Lackmus-Lactose-Agars, wenn man von dem stärkeren Sodazusatz absieht, der Erneuerungsmethode von gewöhnlichem Nähragar. Nunmehr löst man pro Liter Nährboden in je 130 cm³ *Kahlbaumscher* Lackmuslösung unter Erwärmen je 10 g Milhzucker auf und fügt das Ganze dem Nährboden zu. Zu dieser Mischung kommen ferner pro Liter Nährflüssigkeit je 10 cm³ einer frisch bereiteten 0·1 %igen Krystallviolett-B-Lösung. Durch Zugabe von einigen Tropfen 10 %iger Sodalösung stellt man den Nährboden auf eine schwach alkalische Reaktion ein.

4. Regenerierung von *Endo*-Agar nach *Rieckenberg*.

Regenerierung des *Endo*-Agars. Der gebrauchte Agar wird in einer emaillierten Kanne im Dampftopf vollständig verflüssigt. Zum heißen Agar werden dreimal je 3 g Entfärbungspulver (*Kahlbaum*) pro 1 l zugesetzt, gut vermischt und jedesmal 5—10 Minuten im Dampftopf gekocht. Darauf wird der Agar durch Kochen mit 20 cm³ Serum oder defibriniertem Blut geklärt. Bei langsamem Abkühlen in einem zylindrischen Gefäß setzen sich Kohle und koaguliertes Eiweiß zu Boden und können durch Abschneiden vom darüberstehenden klaren Agar getrennt werden. Die Konzentration des Agars bestimmt man, indem man Platten mit steigendem Wasserzusatz gießt. Nach Vergleich mit einer 3 %igen Agarplatte kann dann der zur Verdünnung erforderliche Wasserzusatz berechnet werden. Durch Addition dieser Wassermenge zu dem regenerierten Agar bestimmt man die Gesamtmenge, löst in der gefundenen Wassermenge die für die Gesamtmenge berechnete Menge *Liebigs* Fleischextrakt und Pepton (je 6 g pro Liter), neutralisiert und filtriert. Jetzt wird der Agar so weit vorsichtig schwach mit verdünnter Salzsäure angesäuert, daß nach dem Kochen blaues Lackmuspapier eben gerötet wird, neutralisiert darauf wieder, daß rotes Lackmuspapier schwach gebläut wird und blaues unverändert bleibt. Nun wird der Agar mit der Pepton-Fleischextrakt-Lösung vermischt, in der gewohnten Weise alkalisiert (mit je 10 g 10 %iger Sodalösung pro Liter) und 4 g Milhzucker, 5 cm³ konzentrierte alkoholische Fuchsinlösung und 2·5 g Natriumsulfit in 25 cm³ Wasser zugesetzt.

Um einer zu großen Anhäufung von Salzen, die dem Bakterienwachstum schädlich sein könnten, vorzubeugen, wird nach jedem vierten oder fünften Regenerieren der Agar gewässert.

5. Regenerierung von Agar und *Endo*-Agar nach Ströbner.

Regenerierung von Agar. Der verbrauchte Agar wird in einem emaillierten Topf in strömendem Dampf (ohne Zusatz von Wasser) verflüssigt und dann in einem Meßkolben abgemessen. Kein Alkalizusatz. Nun gibt man zu je 1 l verflüssigten Agars 40 g fein pulverisierte Tierkohle und kocht 30—40 Minuten in Dampf. Dann kühlt man auf 50° ab und setzt zu je 1 l flüssigen Agars 40 cm³ defibriniertes Blut. Abermaliges Kochen in strömendem Dampf 40 Minuten lang. Filtration. Zum abfiltrierten, nunmehr ganz klar gewordenen Agar gibt man Fleischbouillon oder 1—1·5%ige *Liebig*-Bouillon hinzu, u. zw. 300 cm³ auf je 1 l filtrierten Agars. Sterilisation.

Regenerierung von *Endo*-Agar. Man löst den verbrauchten *Endo*-Agar in einem Emailtopf in strömendem Dampfe auf, mißt ihn dann in einem Meßkolben ab, gibt zu je 1 l verflüssigten Agars 50 g Tierkohle und kocht diese Mischung 30—40 Minuten lang im Dampftopf. Es empfiehlt sich öfteres Umrühren. Nun kühlt man die Mischung auf 50° ab, u. zw. immer bei Zimmertemperatur unter fortwährendem Umrühren, damit Klumpenbildung verhindert werde, und setzt zu je 1 l Agar 50 cm³ defibriniertes Blut. 40 Minuten langes Kochen im Dampfe. Um ein Überlaufen der Masse, das selbst bei Watteverschluß vorkommt, zu verhindern, ist es notwendig, ein 3—4mal größeres Gefäß, als die zu verarbeitende Agarmenge faßt, zu verwenden. Filtration. Sterilisation. Der filtrierte Agar ist schön durchsichtig, mit einem ganz leichten rosafarbenen Stich. Zu 1 l filtrierten Agars gibt man dann 300 cm³ Fleisch- oder *Liebig*-Bouillon (1—1·5%ig), 4 g Milchzucker, 4 cm³ alkoholische konzentrierte Fuchsinlösung und 2 cm³ 10%ige Natrium-sulfurosum-Lösung. Hinzugabe von Alkali konnte immer entbehrt werden. Sterilisation.

Der zu regenerierende Agar darf in ungeschmolzenem Zustande — selbst im Eisschrank — höchstens 3—4 Tage stehen, da er sonst zur Regeneration unbrauchbar wird. Auch empfiehlt es sich, den schon fertigen, regenerierten *Endo*-Agar (was ja auch vom Fleisch bereiteten gilt, doch hier noch mehr) bald, in 1—2 Tagen, zu benutzen, da er sich sonst zu rot färbt.

6. Regenerierung von *Endo*-Agar und Malachitgrün-agar nach Kuhn und Jost.

Vorschrift für die Regenerierung von *Endo*. Der zu regenerierenden Agarmasse, die auf Lackmusneutralpunkt einzustellen

ist, werden nach der Verflüssigung auf je 1000 cm^3 8 g Bariumsuperoxyd zugesetzt; sie wird unter Umrühren bis zur völligen Entfärbung im Kochen erhalten. Nach erfolgter Entfärbung ist eine wässrige Lösung von 7 g Natriumsulfat heiß zuzusetzen. Hierauf werden etwa 20 g Tierkohle oder Eponit in die Masse eingerührt und das Ganze einmal kräftig aufgekocht. Man läßt den Niederschlag absetzen und klärt, wie üblich, mit Hühnereiweiß. Vor der Klärung setzt man zu 1000 cm^3 Nährboden 6.5 g Pepton und 6.5 g *Liebigs* Fleischextrakt hinzu. Der Zusatz von Milchzucker wird von einer jeweiligen Milchzuckerbestimmung (nach K. B. Lehmann) im fertigen neuen *Endo*-Agar abhängig gemacht. Der Agargehalt wird nach der Regenerierung in der von *Mohorčič* angegebenen Weise festgestellt und ergänzt.

Regenerierung von Malachitgrünagar. 1000 cm^3 verflüssigter Nährboden erhalten einen Zusatz von 20 cm^3 15%iger Natronlauge, sowie nach Umrühren 15 cm^3 30%iges Wasserstoffsuperoxyd. Die Masse wird bis zur völligen Entfärbung im Kochen erhalten. Einstellen auf annähernde Lackmusneutralisation. Nach Zusatz von 6.5 g Pepton Witte und 6.5 g *Liebigs* Fleischextrakt erfolgt Klärung mit Eponit oder Tierkohle und Hühnereiweiß in der üblichen Weise.

Kuhn und *Jost* empfehlen, 2 l regenerierten mit 1 l frischem Agar zu vermischen.

Das von *Kuhn* und *Jost* angegebene Erneuerungsverfahren für gebrauchte *Endo*-Nährböden mit Bariumsuperoxyd und Natriumsulfat und nachfolgender Klärung hat *Schürmann* gute Resultate geliefert. Im Gegensatz dazu brachte das Regenerationsverfahren mit Natronlauge und Wasserstoffsuperoxyd bei gebrauchtem Malachitgrünagar ungünstigere Ergebnisse.

Für die Regenerierung von *Endo*-Nährböden empfiehlt *Schürmann* das Verfahren mit Wasserstoffsuperoxyd (30%ig) ohne jeden weiteren Zusatz, mit nachfolgender Klärung und den für die Herstellung von *Endo*-Agar notwendigen Zusätzen.

7. Regenerierung von *Drigalski-Conradi*-Agar, *Endo*-Agar und Malachitgrünagar nach *Friedmann*.

Wiedergewinnung von *Drigalski-Conradi*-Agar. 5 l gebrauchter, sterilisierter Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar werden in der Wärme mit 2.5 cm^3 Essigsäure von 96% versetzt. In die warme Lösung werden allmählich 10 g Zinkstaub eingetragen. Das Gemisch wird $\frac{1}{2}$ Stunde im Dampftopf erhitzt. Hierbei findet eine weitgehende Reduktion des Lackmusfarbstoffes und eine erhebliche Klärung der Agarlösung statt. Die mit Zinkstaub behandelte Flüssigkeit wird mit 10%iger Sodalösung schwach alkalisiert und zur Abscheidung des Zinkcarbonates nochmals $\frac{1}{2}$ Stunde im Dampftopf erwärmt. Die auf 50° abgekühlte Masse wird nach Zusatz von 100 cm^3 Pferde- oder Rinderserum durch $\frac{3}{4}$ —1stündiges Erhitzen im Dampftopf geklärt und langsam über

Nacht erkalten gelassen. Hierbei setzen sich Eiweiß, Zinkstaub, Zinkcarbonat und die Bakterienmassen am Boden des Emailtopfes ab.

Der erkaltete Agar wird abgestochen, der Bodensatz durch ein dünnes Wattefilter filtriert. Das Filtrat wird mit dem abgestochenen Agar vereinigt und das Ganze zum dünnen Sirup auf etwa ein Drittel des ursprünglichen Volumens eingeeengt.

Der eingedickte dunkelbraune Agar wird nach dem Erkalten in etwa 2 mm dünne Scheiben geschnitten und ungefähr 24 Stunden gegen fließendes Wasser gewässert. Die Wässerung des eingedickten und in dünne Scheiben zerschnittenen Agars gelingt vollständig im Gegensatz zu der Wässerung des nicht eingeeengten Agars und liefert farblose Scheiben, die teilweise von ausgeschiedenem, unlöslichem Lackmusfarbstoff und koaguliertem Eiweiß durchsetzt sind. Sie werden in soviel geklärter Hefebrühe (Darstellung nach *Friedmann*) gelöst, daß das Volumen der Lösung $4\frac{1}{2}$ l beträgt. Zur Klärung und Entfernung des Ungelösten wird die Lösung mit 10—15 g Tierkohle, die in vier Portionen unter häufigem Umschütteln eingetragen wird, 20 Minuten in der Wärme behandelt. Darauf Zusatz bei 50° von 80 cm³ Pferde- oder Rinderserum. Nach $\frac{3}{4}$ stündigem Erwärmen im Dampftopf wird durch ein doppeltes Papierfilter filtriert. Zum Schluß wird das farblose klare Filtrat eingeeengt, bis eine Probe, zu 10% mit Lackmuslösung versetzt, die gewünschte Festigkeit hat.

Die Verluste an Agar im Wiedergewinnungsverfahren betragen etwa 15%.

Aus dem Agar erfolgt dann die Herstellung des *Drigalski*-Agars.

Regenerierung von *Endo*-Agar. Aus Fuchsinagar wird der Agar in ähnlicher Weise wiedergewonnen wie aus *Drigalski*-Agar.

Erneuerungsverfahren für Fuchsinagar. Während lackmushaltige Nährböden im Gebrauch die Reinheit ihrer Färbung verlieren, findet dies bei fuchsinhaltigen Nährböden nicht statt. Fuchsin scheint durch die Bakterien nicht in nennenswerter Weise angegriffen zu werden. Bei der Erneuerung von Fuchsinagar ist daher das Bestreben, den Farbstoff mehr oder weniger vollständig zu entfernen, unbegründet; es kommt hier einzig darauf an, den benutzten Fuchsinagar zu klären. Dies ist von *Rieckenberg* richtig erkannt worden. In Anlehnung an dieses Verfahren gibt *Friedmann* eine Vorschrift, die sich ihm für die mehrfache Benutzung von Fuchsinagar bewährt hat.

1 l schwach alkalischer, gebrauchter Fuchsinagar wird zunächst durch $\frac{1}{2}$ stündiges Erwärmen im Dampftopf sterilisiert, auf 50° abgekühlt, mit 20 cm³ Pferdeserum versetzt und $\frac{3}{4}$ Stunden im Dampftopf erwärmt. Darauf wird im Dampftopf durch ein doppeltes Papierfilter filtriert, das klare, rote Filtrat mit 10%iger Sodalösung schwach alkalisiert und nach Zusatz von 5 g Pepton im Dampftopf bis zur Lösung des

Peptons erwärmt. Nach dem Lösen des Peptons werden 4 g Milchsucker und soviel alkalische, gesättigte Fuchsinlösung hinzugesetzt, daß die Farbe des ungebrauchten, nicht entfärbten Fuchsinagars erhalten wird. Hierzu ist 1 cm^3 alkoholische, gesättigte Fuchsinlösung oder weniger nötig. Darauf wird 10%ige Natriumsulfatlösung unter Schütteln hinzugefügt, bis der Schüttelschaum weißlich geworden ist. Hierzu sind etwa 25—30 cm^3 erforderlich. Zum Schluß wird das Ganze 20 Minuten im Dampftopf sterilisiert.

Das Wiedergewinnungsverfahren kommt erst in Frage, wenn der Endo wiederholt erneuert worden ist.

Regenerierung von Malachitgrünagar. Wiedergewinnungsverfahren ähnlich wie oben.

Erneuerungsverfahren: Die völlige Entfernung des Malachitgrüns aus gebrauchtem Malachitgrünagar gelingt leicht durch Digerieren mit wirksamer Tierkohle und anschließendes Klären mit Eiweiß.

Vorschrift für das Erneuerungsverfahren: 5 l schwach alkalischer, sterilisierter, gebrauchter Malachitgrünagar werden in der Wärme mit 10—15 g Tierkohle, die in vier Portionen unter häufigem Umschütteln eingetragen werden, $\frac{1}{2}$ Stunde behandelt. Darauf werden bei 50° 100 cm^3 Pferdeserum hinzugefügt. Das Ganze wird $\frac{3}{4}$ Stunden im Dampftopf erwärmt. Die Filtration durch ein doppeltes Papierfilter liefert eine farblose, malachitgrünfreie Agarlösung, die nach kurzem Nachsterilisieren wieder zu verwenden ist. Sollte die Festigkeit des so gewonnenen Agars zu wünschen übrig lassen, so kann der Agar eingeeengt werden. Die Menge des zuzusetzenden Malachitgrüns wird nach Schindler bestimmt. Von einem Zusatz von Pepton muß abgesehen werden.

8. Regenerierung von Metachromgelb-Dreifarben-nährböden nach Zeißler und Gaßner.

1. Das Volumen des zu regenerierenden Nährbodens wird geschätzt (etwa 18 Drigalski-Schalen von ca. 20 cm Durchmesser entsprechen einem Liter).

2. Für je 1 l des zu verarbeitenden, gebrauchten Nährbodens werden ca. 75 cm^3 15%ige Natronlauge in den zur Aufnahme der Drigalski-Schalen bestimmten Emailtopf vorgelegt.

3. Nach Entfernen der Deckel werden die Kulturschalen mit dem gebrauchten Nährboden ohne jede Vorbehandlung in dem hinreichend groß gewählten Emailtopf so aufgestellt, daß der bei dem folgenden Kochen flüssig werdende Nährboden nicht in den Kulturschalen bleiben kann, sondern auf den Boden des Emailtopfs abtropft und sich hier mit der vorgelegten Natronlauge vermischen muß.

4. Der so beschickte Emailtopf wird, um Zutritt von Kondenswasser aus Autoklav oder Dampftopf zu verhindern, mit Deckel verschlossen und kommt auf 2—3 Stunden in strömenden Dampf (*Kochscher Dampftopf*) oder 1 Stunde in gespannten Dampf (Autoklav).

5. Aus dem noch heißen Emailtopf werden die nunmehr leeren Kulturschalen entfernt, und wird der flüssige Nährboden in geeignete, flache Schalen in höchstens 5 cm hoher Schicht zum Erstarren ausgegossen.

6. Der erstarrte Nährboden wird in Prismen von 1—2 cm² Querschnitt zerschnitten.

7. Die Stücke werden 48 Stunden lang in strömendem Leitungswasser in einem möglichst großen Spülbecken gewässert; das Wasser muß unten zu-, oben abfließen; die Strömung muß so stark sein, daß in keinem Teile des Beckens Stagnation möglich ist.

8. Die gewässerten Nährbodenstücke werden zum Abtropfen auf einem Sieb gesammelt.

9. Die gesammelte Nährbodenmasse wird im Dampftopf verflüssigt und dann auf ca. 50° abgekühlt. Zur Klärung werden auf je 1 l Nährboden 20 g Kohle und 50 cm³ Serum n a c h einander zugegeben, gründlich durchgeschüttelt und die ganze Masse etwa 1/2 Stunde lang bei ca. 50° gehalten. Darnach wird aufgekocht und der Nährboden zum Absinken der ungelösten Partikel längere Zeit flüssig gehalten oder besser durch Filtrierpapier filtriert.

10. Von der so gewonnenen Agarlösung wird eine Trockensubstanzbestimmung gemacht; die Lösung wird durch Eindicken auf dem Wasserbade oder durch Zugeben von Wasser auf einen Agargehalt von 3% gebracht.

Das Regenerat stellt eine Agarlösung dar, die nur Spuren von Nährsubstanzen, darunter aber keine störenden C-Verbindungen (Zucker u. a.) enthält, ferner keine störenden Farbreste und keine wachstumshemmenden Stoffe. Das Erstarrungsvermögen des Agars läßt das erhaltene Regenerationsprodukt ebenfalls brauchbar erscheinen.

Die weitere Verarbeitung des regenerierten Agars geschieht folgendermaßen:

Zu 2 l regenerierter Agarlösung füge man

10 g NaCl,

20 g Fleischextrakt (Hefeextrakt),

20 g Pepton Witte (in ca. 50 cm³ Wasser vorher gelöst).

Nach Aufkochen nochmaliges Einstellen der Reaktion auf schwach lackmusalkalisch, Absetzenlassen oder Filtrieren. In dieser Form ist der Agar als einfacher Nähragar auch zur Impfstoffgewinnung ohneweiters brauchbar: zur Herstellung eines Spezialnährbodens für Stuhluntersuchungen füge man nach der Originalvorschrift von *Gaßner* hinzu:

1. 125 cm³ einer 2%igen Lösung von Metachromgelb IIRD (2 Minuten gekocht);

2. 175 cm³ einer 1%igen Lösung von Wasserblau 6 B extra P + 100 g Milchzucker (10 Minuten gekocht).

9. Regenerierung von *Endo*-Agar, *Drigalski*-*Conradi*-Agar und Malachitgrünagar nach *Zipfel*.

Regeneration von *Endo*-Agar. Aus den gebrauchten Platten werden die roten *Endo*-Agarscheiben mit einem Messer herausgehoben und in einem geräumigen Glas- oder Porzellengefäß gesammelt. 70—75 *Endo*-Platten von 10 cm Durchmesser entsprechen etwa 1 l flüssigen Agars. Zu den gesammelten Agarscheiben fügt man nach und nach, unter Umrühren mit einem Glasstabe, so viel 3%ige Salzsäurelösung (3 : 100), daß die Flüssigkeit die Agarstückchen vollständig bedeckt.

Unter öfterem kräftigen Umrühren, wodurch die Agarscheiben zerkleinert und die Bakterienrasen abgespült werden, läßt man die Salzsäurelösung 1 Stunde lang einwirken. Nach dieser Zeit sind pathogene Keime (Typhus, Dysenterie, Cholera) vernichtet und die roten Agarstückchen gelblich geworden, da durch den Säureüberschuß das gefärbte Fuchsin Salz in die ungefärbte Triacidverbindung übergegangen ist.

Der Agar wird nunmehr auf einen Siebboden gebracht — die Salzsäurelösung, in welche die Hauptmenge Pepton und Fleischextrakt übergegangen ist, kann gesondert aufgefangen und auf Pepton und Fleischextrakt verarbeitet werden — und unter der Wasserleitung mit kräftigem Strahl abgespült, bis das ablaufende Wasser klar erscheint. Nach gutem Abtropfen gibt man die Agarstückchen in ein geräumiges Gefäß und wässert unter öfterem Wasserwechsel 24 Stunden. Während des Wässerns nehmen das Waschwasser und der Agar einen roten Ton an, die Triacidverbindung des Fuchsin ist in die Monacidverbindung übergegangen.

Die gut abgetropften, rötlichen Agarstückchen werden nunmehr ohne jeden Wasserzusatz im Dampftopf verflüssigt. Zu 1 l dieses verflüssigten Agars fügt man hinzu:

8—10 cm³ 10%ige Sodalösung,

40 cm³ einer filtrierten und sterilisierten Lösung von 20% Pepton und 20% Fleischextrakt oder Fleischersatz und sterilisiert 1 Stunde im Dampftopf.

Um als *Endo*-Agar verwendet zu werden, erhält der Agar folgende Zusätze pro Liter:

3 cm³ alkoholische Fuchsinlösung,

25 cm³ 10%ige Natriumsulfitlösung (frisch bereitet) und

8 g Milchzucker (vorher in wenig Wasser gelöst).

Der in Platten ausgegossene, erstarrte, regenerierte *Endo*-Agar ist in der Durchsicht klar und farblos und unterscheidet sich hinsichtlich Konsistenz, Wachstumseignung und Farbenumschlages in keiner Weise von frisch zubereitetem.

Will man gebrauchten *Endo*-Agar vollständig entfärben, um ihn als gewöhnlichen Nähragar zu verwenden, so bringt man die Agarstückchen, anschließend an die Salzsäurebehandlung, nach kurzem Abspülen mit Wasser in eine 0·5%ige Natriumhydroxydlösung und beläßt sie so lange darin, bis der Agar keinen rötlichen Farbton mehr zeigt. Dann ausreichende Wässerung, bis der Agar neutral reagiert. Weiterverarbeitung unter Zusatz von Pepton und Fleischextrakt. Ein eventuell beim Kochen wieder auftretender Farbton (hellrosa) kann durch Zusatz von 1 cm^3 einer 1%igen Bismarekbraunlösung pro Liter vollkommen verdeckt werden. Aussehen, Konsistenz, Erstarrungsfähigkeit und Wachstums-eignung wie frisch bereiteter, gewöhnlicher Agar.

Regeneration von *Drigalski*-Agar. Säurebehandlung und kurzes Abspülen mit Wasser zur Entfernung des Bakterienrasens. Die rot gefärbten Agarstückchen nehmen in der anschließenden 24stündigen Wässerung zum Teil blaue Färbung an. Nach dem Wässern bringt man den Agar in eine ganz schwache Sodalösung (0·1%), beläßt ihn so lange darin, bis er durchwegs blaue Farbe angenommen hat. Abspülen, anschließend kurzes Wässern. Der gut abgetropfte Agar wird verflüssigt, mit Pepton und Fleischextrakt versetzt und sterilisiert. Die Weiterverarbeitung erfolgt nach der Originalvorschrift.

Regenerierter *Drigalski*-Agar zeigt den Nachteil, daß durch jedesmal erneuten Zusatz von 130 cm^3 Lackmuslösung pro Liter die Konsistenz des erstarrten Agars nicht befriedigt. Diesen Übelstand beseitigt man dadurch, daß man die käufliche *Kahlbaumsche* Lackmuslösung vor dem Zusatz zum Agar fünffach konzentriert. Man dampft z. B. 250 cm^3 auf 50 cm^3 ein. Von dieser konzentrierten Lackmuslösung setzt man dem Agar pro Liter nur 20 cm^3 zu.

Regeneration von *Malachitgrün*agar. Malachitgrünagar läßt sich nach dem Verfahren für *Endo*-Agar ebenfalls wieder verwendungsfähig machen: Salzsäurebehandlung, gründliche Wässerung, Schmelzen des gewässerten Agars, Zusatz von Pepton und Fleischextrakt, Sterilisation. Der erneute Malachitgrünzusatz regelt sich nach der Reaktion des Agars. Da geringe Schwankungen der Reaktion — je mehr Alkali, umso weniger Malachitgrün und umgekehrt — auf die Wachstumseignung des Agars von großem Einfluß sind, so ist die optimale Malachitgrünkonzentration für jede Portion regenerierten Agars jedesmal durch Versuche festzustellen.

10. Wiedergewinnung von gebrauchtem Agar nach *Kaunitz und Moßler*.

Das Bestreben der Autoren war auf die Ausarbeitung eines Verfahrens gerichtet, welches nicht die Erneuerung der gebrauchten Nährböden, sondern die Zurückgewinnung des Agars selbst in möglichst unverändertem Zustande und frei von den sonstigen, in den Nährböden enthaltenen Stoffen gestattet.

Gang des Verfahrens: Der Inhalt der Petrischalen und Kulturröhrchen wird mittels eines Holzstabes in einen größeren Emailtopf gegeben und dann im Dampf gründlich sterilisiert. Die wieder fest gewordene Masse wird, nachdem sie zerkleinert worden ist, mit ungefähr der doppelten Menge warmen Wassers zu einem nicht zu dicken Brei angerührt und bei 35—36° mit einer Reinkultur von *Bacterium coli* versetzt. Die Einwirkung der Kolibakterien führt man am besten in einer Glaswanne durch, da man das Ende der Vergärung daran erkennen kann, daß die feste Masse sich nach dem Aufhören der Gasbildung von der Flüssigkeit scharf absetzt. Gewöhnlich ist die Vergärung nach 24 Stunden beendet. Während der Vergärung tritt eine intensivere Rötung ein. Nach dem Ende des Gärprozesses bringt man die Masse auf ein Sieb zum Abtropfen und dann wieder in das Gefäß zurück, wo sie in fließendem Wasser ausgewaschen wird. Die Geschwindigkeit ist so zu regeln, daß durch das zuströmende Wasser eine gewisse Durchmischung des Inhaltes der etwa bis zur Hälfte mit Agarstückchen gefüllten Wanne stattfindet, aber noch keine Agarteilchen emporgerissen werden. Das Auswässern wird fortgesetzt, bis das überstehende Wasser vollkommen klar und farblos ist. Auf den Waschprozeß, der etwa 2 Tage braucht, folgt die Entfernung des von den Agarstückchen noch festgehaltenen Farbstoffes durch die Bleiche. Man füllt nach Entfernung des überstehenden Wassers die Masse als dicken Brei in starkwandige Flaschen bis etwa Zweidrittelhöhe und leitet Chlorgas ein. Nach 3—4maligem Einleiten hört man mit der Gaszufuhr auf, bringt den noch schwach nach Chlor riechenden Brei in die Wanne zurück und läßt noch etwa eine Stunde stehen, damit das Chlorgas von den Agarstückchen absorbiert wird und langsam in die Tiefe dringen kann. Das Bleichen kann auch durch Zusatz von Chlorkalklösung bewerkstelligt werden.

Nach dem Bleichen wird Natronlauge bis zur schwach alkalischen Reaktion hinzugesetzt, läßt wieder eine Stunde stehen und fährt dann mit dem Auswaschen fort, bis das ablaufende Wasser klar und farblos ist und beim Rühren keine Schaumbildung mehr eintritt. Der nunmehr gewaschene und gebleichte Agar hält meist Spuren von Chlor absorbiert, die an das Waschwasser nur langsam abgegeben werden. Zur Vernichtung des Chlors säuert man mit verdünnter Salzsäure schwach an und setzt vorsichtig eine schwache Lösung von Natriumsulfit zu, bis eine Probe des Waschwassers auf Zusatz von Jodkalistärkekleister keine Blaufärbung mehr zeigt, und fügt endlich noch einen geringen Überschuß der Sulfitlösung zu, um auch das in den Agarstückchen absorbierte Chlor wegzuschaffen. Nachdem man etwa eine Stunde das Natriumsulfit hat einwirken lassen, wird das Auswaschen fortgesetzt, bis das Waschwasser neutral ist.

Der Agar ist nunmehr fertig gereinigt und schneeweiß, bedarf aber noch einer Klärung mit Hühnereiweiß, um mechanische Verunreinigungen zu entfernen. Dazu läßt man ihn in einem Flanellsack abtropfen,

preßt das überschüssige Wasser möglichst ab, verflüssigt im Wasserbade, rührt nach dem Abkühlen Hühnereiweiß ein und hält dann im siedenden Wasser, bis das Eiweiß koaguliert ist. Nach dem Kolieren durch ein Wattefilter kann man den Agar entweder einfach eintrocknen oder nach dem Konzentrieren und Gießen in Platten zum Trocknen bringen. Da längeres Erwärmen den verflüssigten Agar gelb färbt, wird man das Konzentrieren bzw. Trocknen, wenn möglich, im Vakuum vornehmen.

Zur vollständigen Durchführung des Reinigungsprozesses werden etwa 5—6 Tage benötigt.

Über Trocken- und Konservennährböden s. den Artikel von Dörr.

Literatur: *Rudolf Abel*, Bakt. Taschenbuch. 23. Aufl., Kurt Kabitzsch, Würzburg 1920; D. med. Woch. 1893, S. 265. — *Agulhon et Legroux*, C. r. Acad. des Sciences 1918, CLXXVII, p. 597. — *v. Angerer*, A. f. Hyg. 1918, LXXXVII, S. 316. — *Anzilotti*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1906, Orig. XL, S. 765. — *Arnheim*, Deutsche medizinische Wochenschrift 1912, Nr. 20; Zt. f. Hyg. u. Inf. 1914, LXXVI, S. 407. — *Aronson*, D. med. Woch. 1915, S. 1027. — *Babucke*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1906, Orig. XL. — *Baerthlein*, M. med. Woch. 1917, S. 465. — *Baerthlein u. Gildemeister*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1915, Orig. LXXVI, S. 550. — *Baumgarten*, Lehrbuch der pathogenen Bakterien. S. Hirschel, Leipzig 1911. — *Baumgarten u. Langer-Zuckerkindl*, Zt. f. Hyg. 1917, LXXXIII, S. 389. — *Beck*, Festschrift für Robert Koch. 1903. — *Beger*, Berliner klinische Wochenschrift 1921, S. 1155. — *Beijerinck*, Zentralblatt für Bakteriologie. I. Abt. 1896, XIX, S. 257 u. 1897, XXI, S. 101. — *Bernstein u. Epstein*, J. of inf. Diseases 1906, III. — *Besançon, Griffin et le Sourd*, Ann. de Dermat. et Syph. 1901. — *Besredka et Jupille*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1913, p. 1009; Zt. f. Tuberk. 1913, XXI, S. 13. — *Bissérié*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1903. — *Bitter*, Münchner medizinische Wochenschrift 1911, Nr. 13; Deutsche medizinische Wochenschr. 1920, Nr. 30. — *Bocchia*, Zentralblatt für Bakteriologie. I. Abt., 1911, Orig. LX, S. 434. — *Bolton*, Med. News 1887, I, Nr. 12 (zit. nach Günther, Lehrbuch). — *Bordet et Gengou*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1906. — *Bosse*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1903, Orig. XXXIII, S. 471. — *Bramigk*, Zbl. f. Bakt. Abt. I, 1921, LXXXVI, S. 427. — *Bruschettini*, Ann. dell' Ist. Maragliano 1907, p. 1. — *Bürger*, Zentralblatt für Bakteriologie. I. Abt., 1917, Orig. LXXXIX, S. 462. — *E. Bumm*, D. med. Woch. 1885, S. 910. — *Burckardt*, Inaug.-Diss. Bern 1910. — *Cantani*, Zbl. f. Bakt. I, 1909, Orig. LIII, S. 471. — *Capaldi*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1896, XX, S. 800. — *Celli*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1896, XIX, S. 536. — *Celli u. Fiocca*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1894, XV, S. 470. — *F. Cohn*, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen 1872, I. — *Conradi*, Vorarbeiten zur Bekämpfung der Diphtherie. G. Fischer, Jena 1913; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Ref. XLII, S. 47; D. med. Woch. 1908, S. 1222. — *Conradi u. Troch*, M. med. Woch. 1912, S. 1652. — *Cornet u. Kossel*, Tuberkulose in Kolle u. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., G. Fischer, Jena 1913, V. — *Costa, Troisier et Dauvergne*, Presse méd. 1919, p. 113. — *de Cristina u. Cannata*, Gaz. degli Ospedali 1910, p. 505. — *Gertrud Dietel*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1917, Orig. LXXIX, S. 183. — *Dieterlen*, Tuberkulose-Arb. a. d. kais. Ges. X, S. 115. — *Dieudonné*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. L, S. 107. — *Doepner*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. L, S. 552. — *Dorset*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., Orig. XXXIII, S. 276. — *v. Drigalski*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1906, Orig. XLI, S. 298; Veröffentl. auf dem Gebiete des Militär-Sanitätswesens. 1902, H. 20. — *v. Drigalski u. Conradi*, Zt. f. Hyg. 1902, XXXIX, S. 283. — *Eijkmann*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., X, S. 531. — *James Eisenberg*, Bakteriologische Diagnostik. 3. Aufl., 1891. — *Elschnig*, D. med. Woch. 1910, Nr. 26. — *Elsner*, A. f. Hyg. 1894, XXI, S. 140; Hyg. Rundschau 1894, S. 296. — *S. Endo*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1904, Orig. XXXV, S. 109. — *P. Esch*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. LII, S. 150; M. med. Woch. 1915,

- S. 790. — *v. Esmarch*, Zbl. f. Bakt. 1887, I, Nr. 1. — *Gustav Felsenreich*, Zt. f. Hyg. 1919, LXXXIX, S. 88. — *Ficker*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1900, XXVII, S. 504. — *C. Flügge*, Die Mikroorganismen. F. O. W. Vogel, Leipzig 1896. — *Forster*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1897, XXII, S. 341. — *Fränkel*, D. med. Woch. 1886, Nr. 13. — *C. Fraenkel*, M. med. Woch. 1908; Hyg. Rundschau 1894, S. 772. — *Fraenkel* u. *Reiche*, Zt. f. klin. Med. 1892. — *Frieber*, Zentralblatt für Bakteriologie. Abt. I, 1921, Orig. LXXXVI, S. 424. — *Friedberger* u. *Reiter*, in Kolle u. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., G. Fischer, Jena 1913, I. — *E. Friedmann*, M. med. Woch. 1918, S. 76 u. 133. — *Frosch*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1897, XXI, S. 926. — *Frugoni*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. LIII, S. 553. — *Fügner*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1914, Orig. LXXIV, S. 354. — *Fürth*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Orig. XLVI, S. 81. — *Gaehtgens*, Typhus abdominalis. *Lubarsch-Ostertag*, Ergeb. d. allg. Pathol. u. s. w. 18. Jahrg., I. Abt., 1915; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1916, Orig. LXXVIII, S. 45; A. f. Hyg. 1905, LII, S. 239; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1905, XXXIX, S. 634. — *Galimard* u. *Lacomme*, Hyg. Rundschau 1908, S. 652. Ref. — *Galli-Valerio*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1915, Orig. LXXXVI, S. 511. — *de Gaspari* u. *Savini*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1911, Orig. LVIII, S. 248. — *Gaßner*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1917, Orig. LXXIX, S. 308; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1918, Orig. LXXX, S. 120 u. 219. — *Geilinger*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1916, Orig. LXXVII, S. 446. — *Gelhaar*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1916, Orig. LXXVIII, S. 312. — *Ghon* u. *v. Preyß*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1904, Orig. XXXV, S. 536. — *Gildemeister* u. *Baerthlein*, M. med. Woch. 1915, Nr. 21. — *Globig*, Zt. f. Hyg. 1887, III, S. 298. — *Griffith*, zit. nach *Löwenstein*, Lehrbuch. — *C. Günther*, Einführung in das Studium der Bakteriologie. Georg Thieme, Leipzig; D. med. Woch. 1889, Nr. 20. — *Guggenheimer*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1916, Orig. LXXVII, S. 363. — *Guth*, D. med. Woch. 1915, S. 1544; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. LI, S. 190. — *Harras*, M. med. Woch. 1906, S. 2237. — *C. Hart*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. L, S. 494. — *S. Hata*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1914, LXXII, S. 107. — *van der Heide*, A. f. Hyg. 1897, XXXI, S. 82. — *Heim*, Lehrb. der Bakteriologie. 5. Aufl., F. Enke, Stuttgart 1918; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1901, XXX, S. 570; Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1893, XIII, S. 649; D. med. Woch. 1907, S. 1587. — *Heinemann*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1907, XL, — *Heller*, Berl. klin. Woch. 1890, S. 893. — *Erich Hesse*, Arb. a. d. Reichs-Ges. 1920, LII, S. 596. — *Gust. Hesse*, Zt. f. Hyg. 1904, XLV, S. 1. — *W. Hesse*, Zt. f. Hyg. 1892, XI, S. 238; Zt. f. Hyg. 1899, XXXI, S. 502. — *v. Hibler*, Untersuchungen über die pathogenen Anaeroben. G. Fischer, Jena 1908. — *Hirschbruch* u. *Dietl*, D. med. Woch. 1915, S. 606. — *Hofer* u. *Hovorka*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXXI, S. 163. — *W. Hoffmann*, Zt. f. Hyg., LXVIII; Berl. klin. Woch. 1911. — *Holz*, Zt. f. Hyg. 1890, VIII, S. 159 u. 162. — *Hopffe*, M. med. Woch. 1917, Nr. 5. — *Hottinger*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXVII, S. 178. — *Hübener*, Fleischvergiftungen und Paratyphusinfektionen. Gust. Fischer, Jena 1910. — *Hueppe*, Zentralblatt für Bakteriologie. 1887, I, S. 610; Zentralblatt für Bakteriologie 1888, IV, S. 80; Bakterienforschung. C. W. Kreidel, Wiesbaden 1891. — *Hundeshagen*, Deutsche med. Woch. 1918, S. 1181. — *Huntemüller*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. L, S. 109. — *Ickert*, D. med. Woch. 1918, S. 186. — *Inada*, Zt. f. Kinderheilk. 1912, IV; J. of exp. med. 1916, XXIII, Nr. 3. — *Jochmann*, D. med. Woch. 1906, Nr. 11. — *Jötten*, Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt 1920, LII, S. 339. — *Joos*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1899, XXV, S. 296. — *Jurewitsch*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, XLVII. — *Kabeshima*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1913, Orig. LXX, H. 3/4. — *Kahlfeld* u. *Wahlich*, Bakt. Nährbodentechnik. Urban & Schwarzenberg, Berlin 1916. — *Kammann*, Patentschrift Nr. 307.831, Klasse 30 M, Gruppe 14. — *Kanthack* u. *Stephens*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1896, XIX. — *Kartulis*, Die Amöbendysenterie, Kolle-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., VII. — *Kaspereck*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1902, Orig. XXXII. — *Kathe* u. *Blasius*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. LII, S. 586. — *Kaunitz* u. *Moßler*, Wr. med. Woch. 1917, S. 340. — *Kiefer*, Beitr. z. Geburtshilfe u. Gynäk. Festschrift für A. Martin. 1895, S. 146. — *E. u. A. Kindborg*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Orig. XLVI, S. 554. — *M. Kirchner*, Zt. f. Hyg. 1890, VIII, S. 465. — *Kitasato*

u. *Weyl*, Zt. f. Hyg. 1890, VIII, S. 43. — *Karl Klein*, D. med. Woch. 1920, S. 297. — *Knorre*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1917, Orig. LXXIX, S. 114. — *Josef Koch*, in Kolle-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., IV. — *R. Koch*, Mitt. a. d. kais. Ges. 1881, I u. 1884, II; D. med. Woch. 1885. — *Köhlisch u. Otto*, Zt. f. Hyg. 1915, LXXX, S. 431. — *Kolle u. Schürmann*, in Kolle u. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., IV. — *Kolle u. Wassermann*, Klinisches Jahrbuch 1906, XV, S. 507. — *Kreßler*, Zentralblatt für Bakteriologie. I. Abt., 1918, Orig. LXXX, S. 380. — *Kuhn u. Jost*, Münchner medizinische Wochenschrift 1916, S. 1388. — *Kühne*, zit. nach *Löwenstein*, Lehrbuch. — *Kuntze*, Zentralbl. f. Bakt. I. Abt., 1907, Orig. XLIV, S. 300. — *Ernst Küster*, Kultur der Mikroorganismen. B. G. Teubner, Leipzig-Berlin 1913. — *Kutscher*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Orig. XLV, S. 286; In Kolle u. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., III u. IV. — *H. Langer*, D. med. Woch. 1916, S. 515; 1917, S. 720. — *Langstein u. Mayer*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1904, Orig. XXXV. — *Laubenheimer*, Allgemeine Bakteriologie und Sterilisationslehre. G. Fischer, Jena 1915. — *Laveran u. Pettit*, C. r. soc. de Biol. 1910, p. 114; Bull. Soc. de Pathol. exot. 1910, p. 216. — *K. B. Lehmann u. R. O. Neumann*, Atlas und Grundriß der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 6. Aufl., J. F. Lehmann, München 1920. — *Lenght*, zit. nach *Stein*, in Kolle u. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. — *Lentz*, in Kolle u. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., III. — *Lentz u. Tietz*, Klin. Jahrb. 1905, XIV, S. 495. — *Leuchs*, D. med. Woch. 1906, S. 1330. — *Levinthal*, Zt. f. Hyg. 1918, LXXXVI, S. 1. — *E. Levy u. K. Aoki*, Zt. f. Imm. 1910, VII, S. 435. — *Liborius*, Zt. f. Hyg. 1886, I, S. 168. — *Stefanie Lichtenstein*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1916, Orig. LXXXVII, S. 362. — *Lieberknecht*, A. f. Hyg. 1909, LXVIII. — *v. Liebermann u. Acél*, D. med. Woch. 1914, S. 2093. — *v. Lingelsheim*, Klin. Jahrb. 1906, XV, S. 373. — *Lipschütz*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1904, XXXVI, S. 743; A. f. Dermatol. u. Syph., LXXXVI u. LXXXVII. — *Lockemann*, D. med. Woch. 1918, Nr. 26; Veröff. d. Robert Koch-Stiftung 1918, II, H. 2. — *Löffl*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1916, Orig. LXXXVII, S. 108. — *Loeffler*, Mitt. a. d. kais. Ges. 1884, II; D. med. Woch. 1906, S. 289; 1907, S. 1581; 1909, S. 1297. — *van Loghem u. Nieuwenhuijse*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1918, Orig. LXXX, S. 383. — *Löwenstein*, Vorlesungen über Bakteriologie, Immunität u. s. w. der Tuberkulose. G. Fischer, Jena 1920. — *Lubenau*, Hyg. Rundschau 1907, S. 1455. — *M. Mandelbaum*, M. med. Woch. 1909, S. 2475; 1912, S. 306. — *Mandelbaum u. Heinemann*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1910, Orig. LIII, H. 3. — *Manteufel*, Deutsche medizinische Wochenschrift 1921, Nr. 17. — *Marmorek*, zit. nach *Löwenstein*, Vorlesungen. — *Marpmann*, Zentralblatt für Bakteriologie. I., 1894, XVI. — *Marx*, Die exp. Diagnostik u. s. w. der Infektionskrankheiten. 3. Aufl., A. Hirschwald, Berlin 1914. — *Martin Mayer*, in Kolle u. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., VII. — *Megele*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1909, Orig. LII, S. 616. — *Michaelis*, D. med. Woch. 1920, S. 1238 u. 1921, S. 465 u. 673; Zt. f. Immunitätsforschung 1921, XXXI. — *Michaelis u. Gyemant*, Biochem. Zt. 1920, CIX, S. 165. — *Mohorčič*, M. med. Woch. 1915, S. 1143. — *Moldavan*, Das österreichische Sanitätswesen. 1912, Nr. 8. — *Mouton*, Ann. de l'Inst. Pasteur, XVI. — *Much*, in Braun, Schröder u. Blumenthal, Handb. d. Tuberkulose 1914, I. — *Mühlens*, Klin. Jahrb. 1910, XXIII, S. 339; In v. Prowazek, Handbuch d. pathog. Protozoen, I. — *A. Müller*, Arb. a. d. kais. Ges. 1910, XXXIV, S. 164. — *Mc Neal u. Novy*, J. of infect. Diseases 1904, I, p. 1. — *Neisser u. Gins*, in Kolle u. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., V. — *Neufeld u. Haendel*, in Kolle u. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., IV. — *Neufeld u. Woithe*, Arb. a. d. kais. Ges. 1910, XXXIII. — *Nicollé*, Bull. Soc. de Pathol. exot. 1908, p. 121. — *Nocard u. Roux*, Ann. de l'Inst. Pasteur. I, p. 19. — *Nöller*, A. f. Tropenhyg. 1917, S. 53. — *Noguchi*, Berl. klin. Woch. 1912; J. of exp. Med. 1912, XV u. XVI. — *Oberstadt*, Zt. f. Hyg. 1915, LXXIX, S. 134. — *Padlewski*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1908, Orig. XLVII, S. 540; Hyg. Rundschau 1909. — *Pane*, Zbl. f. Bakt. 1894, XVI, S. 229. — *Park u. Krumwiede*, J. of med. Research XXIII,

XXV u. XXVII. — *Pawlowsky*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1888, p. 303. — *Péré*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, p. 520. — *Pfuhl*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1907, Orig. XLIV, S. 378. — *R. Pfeiffer*, D. med. Woch. 1892, S. 28 u. 465; Zt. f. Hyg. u. Inf. 1893, XIII, S. 357. — *W. Pfeiler*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1919, Orig. LXXXIII, S. 298. — *Pfeilschmidt*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1915, Orig. LXXVI, S. 88. — *Pilon*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1911, Orig. LX, S. 330. — *Piorkowski*, Berl. klin. Woch. 1899, S. 145; M. med. Woch. 1900, S. 87. — *Poppe*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1911, LVIII, S. 475. — *Proca*, *Danila* u. *Stroe*, C. r. soc. de Biol. 1912, LXXII. — *Proskauer* u. *Beck*, Zt. f. Hyg. u. Inf. 1894, XVIII, S. 128. — *Rankin*, J. of Hyg. 1911, II, p. 271. — *Reiter*, D. med. Woch. 1917, S. 1201. — *Oswald Richter*, Internat. Revue d. ges. Hydrobiologie u. Hydrographie 1911, II, S. 31. — *H. Rieckenberg*, M. med. Woch. 1917, S. 542. — *Rosam*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1904, XII. — *Rosenthal* u. *Schultz*, Biol. Zbl. 1888, VIII. — *Roux*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1888, Nr. 1. — *Sabouraud* u. *Noiré*, Ann. Dermatol. 1913, IV, p. 439. Ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt., Ref. LX, S. 98. — *Sakharoff*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, p. 451. — *E. u. Th. Savini*, Zbl. f. Bakt. I, 1911, Orig. LX, S. 493. — *Schardinger*, Zbl. f. Bakt. I. 1893. XIII u. 1897, XXII. — *Scheller*, in *Kolle* u. *Wassermann*, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., V; In *Friedberger* u. *Pfeiffer*, Lehrbuch der Mikrobiologie. G. Fischer, Jena 1919, I. — *Schereschewsky*, D. med. Woch. 1912, S. 1335. — *Schill*, Zbl. f. Bakt., V, S. 337. — *Schindler*, Zt. f. Hyg. 1909, LXIII. — *K. E. F. Schmitz*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1915, Orig. LXXVI, S. 306. — *Schneider* u. *Seligmann*, Zt. f. Hyg. 1908, LVIII, S. 415. — *Schottelius*, M. med. Woch. 1908, Nr. 42. — *Schottmüller*, M. med. Woch. 1905, S. 1617 u. 1683. — *Schrank*, Anleitung zur Ausführung bakteriologischer Untersuchungen. Franz Deuticke, Leipzig u. Wien 1894. — *Schröter*, *Cohns* Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 1872, I, S. 111. — *Schrumpf*, D. med. Woch. 1917, S. 1170. — *W. Schürmann*, M. med. Woch. 1917, S. 397. — *Seiffert* u. *Bamberger*, M. med. Woch. 1916, S. 527. — *Serger*, Pharmazeut. Zentralhalle 1916, S. 407. — *Shmamine*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1911, Orig. LXI u. 1912, LXV. — *Th. Smith*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1895, XVIII, S. 3; 1897, XXII, S. 49; J. of exp. Med. 1898, III, p. 401. — *Sobel*, D. med. Woch. 1915, S. 1573. — *Sobernheim*, in *Kolle* u. *Wassermann*, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., VII. — *Sovade*, D. med. Woch. 1911, S. 682 u. 1934. — *Soyka*, D. med. Woch. 1888. — *Spronck*, Ann. de l'Inst. Pasteur 1895, p. 762. — *Stein*, in *Kolle* u. *Wassermann*, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., V. — *Sterling*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1895, I, S. 476. — *Ströbner*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1918, Orig. LXXX, S. 222. — *Sullivan*, Zbl. f. Bakt. II. Abt., XVI, S. 737. — *v. Szaboky*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1907, Orig. XLIII. — *A. Szász*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1915, Orig. LXXV, S. 489; 1916, Orig. LXXVII, S. 111. — *Tarchanow*, zit. nach *Friedberger* u. *Reiter*. — *Tarozzi*, Zbl. f. Bakt. I, 1905, Orig. XXXVIII, S. 619. — *Thalmann*, Zbl. f. Bakt. I, Orig. LXVI, S. 244. — *Tochtermann*, Zbl. f. Bakt. 1895, XVIII, S. 552 u. 1896, XIX, S. 733. — *Uhlenhuth*, Deutsche medizinische Wochenschrift 1917, S. 1553. — *Uhlenhuth* u. *Hübner*, in *Kolle* u. *Wassermann*, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl., III. — *Ungermann*, Arb. a. d. kais. Ges. 1919, LI; Berl. klin. Woch. 1916, S. 408. — *Unna*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1891, IX u. 1892, XI. — *Uschinsky*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1893, XIV, S. 316. — *Vannod*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1906, Orig. XL u. 1907, XLIV. — *Wagner*, M. med. Woch. 1915, S. 772. — *Wassermann*, Zt. f. Hyg. 1898, XXVII, S. 298. — *Weißkopf*, Wr. klin. Woch. 1910, S. 1367. — *Werbitzki*, A. f. Hyg. 1909, LXIX, S. 191. — *Ernst Wertheim*, D. med. Woch. 1891, S. 1351. — *Wildbolz*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1902, XXXI, S. 128. — *Will*, Anleitung zur biol. Untersuchung und Begutachtung von Bierhefe, Bier und Breiwasser u. s. w. München 1909. — *H. Wollin*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1916, Orig. LXXVII, S. 283. — *Wrzosek*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1907, XLIII, S. 17 u. 1907, XLIV, S. 607. — *Wülker*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1911, Ref. L, S. 577. — *Würcker*, Inaug.-Diss. Erlangen 1910. — *Wurtz*, A. de méd. exp. 1892, p. 85 et 383. — *Zeißler* u. *Gaßner*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1918, Orig. LXXX, S. 253. — *Zipfel*, Zbl. f. Bakt. I. Abt., 1918, Orig. LXXX, S. 472. — *Zörkendörfer*, A. f. Hyg. 1893, XVI, S. 380.

Die Züchtung der tierischen Parasiten und Krankheitserreger auf künstlichen Nährböden.

Von Prof. Dr. W. Nöller, Berlin.

Mit 2 schwarzen Tafeln.

I. Die Züchtung der parasitischen Protozoen.

1. Allgemeiner Teil.

Bei der Erforschung der parasitischen Protozoen hat die Züchtung im Gegensatz zu den Bakterien nur eine geringe Rolle gespielt. Das liegt nicht etwa daran, daß die Protozoologie durch das Kulturverfahren nicht weitergebildet und ausgebaut werden kann, sondern nur an der Schwierigkeit der Protozoenzüchtung und an dem geringen Ausbau der Züchtungsmethoden. Während diese bei den Bakterien soweit ausgebildet und vervollkommen worden sind, daß sie das mikroskopisch-morphologische Studium ganz in den Hintergrund gedrängt haben und daß in der Regel das makroskopische Wuchsbild schon mit großer Sicherheit einzelne Bakterien charakterisiert, und während infolge der hohen Entwicklung der Züchtungstechnik die chemische und serologische Erforschung der Bakterien so große Fortschritte gemacht hat, liegen bei der Protozoenzüchtung erst Anfänge vor und die Tatsache, daß auch die Protozoen recht charakteristische Wuchsformen zeigen können, ist erst in den letzten Jahren festgestellt worden. Bei dem komplizierten Entwicklungskreise und Bau der Protozoen, bei ihrer großen Verschiedenheit in ihrer Ernährungsphysiologie und bei ihrer weit größeren Empfindlichkeit gegen äußere Einflüsse und Schädigungen nimmt diese Rückständigkeit der Protozoenkultur nicht sehr wunder.

Am meisten für den Ausbau der Züchtung hinderlich ist der Mangel einer äußeren Membran bei den Protozoen. Wegen ihrer nackten Oberfläche sind sie der Verdunstung des Zellsaftes viel mehr ausgesetzt als die Bakterien, bei denen eine membranartige Hülle einen guten Schutz abgibt. Aus diesem Grunde sind auch der Züchtung auf festen Nährböden so enge Grenzen gezogen. Und gerade die festen Nährböden waren es ja, durch die *Robert Koch* den ungeheuren Aufschwung der

Züchtung erst möglich gemacht hat, weil hier die einzelnen Keime isolierte Einzelkolonien ergeben und dadurch die Trennung von unerwünschten Begleitorganismen mit Leichtigkeit durchgeführt werden kann.

Dann besitzen auch die meisten Protozoen im Gegensatz zu den Spaltpilzen nur eine recht geringe Vermehrungsmöglichkeit und Vermehrungsschnelligkeit. Sind deshalb in dem Ausgangsmateriale oder in einer Kultur Bakterien vorhanden, so ist an eine Reinzüchtung nur sehr selten zu denken, weil die viel schneller wachsenden Spaltpilze die Protozoen überwuchern und durch ihre Stoffwechselprodukte ausrotten.

Aus dem angeführten Grunde macht die Gewinnung von Reinkulturen aus Gemischen mit Bakterien große Schwierigkeiten. Auch das Anzüchten, das ja auch schon in der Bakteriologie nicht immer leicht ist, erfordert hier ganz besondere Sorgfalt wegen der geringen Wachstumsenergie der Protozoen. Einmal angezüchtete Stämme, die schon eine große Massenentfaltung der Tiere enthalten, lassen sich weiter sehr leicht fortzüchten.

In ihrer Ernährungsphysiologie weisen die Protozoen eine viel größere Mannigfaltigkeit auf als die Bakterien. Dort haben wir es nur mit osmotisch sich ernährenden Organismen zu tun. Bei den Protozoen müssen wir verschiedene Gruppen unterscheiden:

1. In Körperflüssigkeiten lebende, osmotisch sich ernährende Protozoen. Diese Gruppe ist am leichtesten zu züchten, u. zw. in ganz der gleichen Weise wie die Bakterien entweder in flüssigen Nährböden oder auf feuchten, flüssigkeitsreichen festen Nährböden.

2. Durch Aufnahme geformter Nahrung (holozöisch) sich ernährende Tiere. Diese müssen mit der ihnen zusagenden Nahrung gefüttert werden. Am leichtesten sind die Bakterienfresser zu behandeln. Die Bakterien werden ihnen im einfachsten Falle lebend durch gleichzeitiges Mitzüchten dargeboten. In einigen Fällen ist auch ihre Verdrängung durch abgetötete Spaltpilze durchgeführt worden und so eine wirkliche Reinkultur an Stelle der Mischkultur getreten. In der gleichen Weise sind die Protozoen zu behandeln, die sich von einer Zellart ihres Wirtes ernähren. Am einfachsten liegt hier die Aufgabe, wenn die gefressene Zellart leicht in Reinheit ohne bakterielle Verunreinigung zu gewinnen ist, wie etwa die Blutkörperchen.

3. Am schwierigsten sind die Zellparasiten unter den Protozoen zu züchten. Die Lösung dieser Aufgabe setzt entweder die sterile Gewinnung dieser Zellart voraus, wie das bei den Blutzellen ja leicht durchführbar ist, oder es müßte eine Gewebeskultur angelegt werden. In letzter Richtung liegen aber erst reine Andeutungen vor.

Die Aufgaben, die die Züchtung in der Protozoologie zu lösen berufen ist, sind kaum weniger vielseitig als in der Bakteriologie. Die genaue morphologische Erforschung bildet ja eine Hauptaufgabe der

Protozoenkunde. In Kultur vorhandene Formen lassen sich nun stets leichter bearbeiten als frei in Leibeshöhlen oder Körpersäften womöglich nur vereinzelt oder durch sehr viel störende Beimengungen verdeckt vorkommende Tiere. Die Haltung parasitischer Formen in Kultur spart Versuchstiere und liefert leicht versendbare Stämme. Bei im Blute nur spärlich vorhandenen Formen, die sich dem mikroskopischen Nachweise entziehen, springt die Züchtung helfend ein, und gerade bei manchen Trypanosomenarten bildet die Züchtung das einzige Mittel zum Nachweise ihrer weiten Verbreitung.

Dann kann die Kultur zum Vergleiche sehr ähnlicher Arten mit sehr gutem Erfolge herangezogen werden. Die Erforschung der Trypanosomen- und der *Leishmania*-Übertragung kann in dieser Hinsicht großen Nutzen aus der Züchtung ziehen. Die Reinkultur eröffnet auch die Bahn für eine chemische und experimentell physiologische Erforschung des Protozoenleibes, und die Serologie und Immunotherapie können sich erst nach gelungener Kultur auswirken.

2. Spezieller Teil.

a) Die Züchtung der Amöben.

Nachdem die Erregernatur der *Entamoeba histolytica* bei der tropischen Dysenterie klargestellt worden war, setzten zahlreiche Versuche ein, diesen Krankheitserreger genau wie die Bakterien zu züchten. Diese Versuche schlugen bis vor kurzer Zeit alle fehl. Sie zeigten aber, daß sich aus dem Kote des Menschen und vieler Tiere häufig, ja geradezu regelmäßig auf den in der Bakteriologie gebräuchlichen Agarzubereitungen saprophytische Amöben der *Limax*gruppe herauszüchten lassen. Diese Amöben sind irrtümlicherweise häufig von in der morphologischen Untersuchung der Protozoen ungeschulten Beobachtern für Dysenterieamöben gehalten worden.

Ihre Lebensweise scheint eine rein saprophytische zu sein. Sie geraten meist nur rein passiv im Cystenzustande durch den Darm des Menschen und der Tiere und schlüpfen erst nach Abgabe der Faeces aus ihren Cysten aus, vermehren sich in den faulenden Faeces stark und bilden nach Erschöpfung der ihnen zusagenden Nahrungsstoffe wieder ihre Dauercysten. Bei katarrhalischen Darmerkrankungen können manche dieser Amöben auch schon im Darme aus der Cyste ausschlüpfen und so zu Halbparasiten werden. Schon *Schaudinn* (1903) hatte ein solches Beispiel bei der beschalteten *Chlamydomyces stercorae* nachgewiesen und studiert. Wegen der Wichtigkeit solcher Befunde bei der Untersuchung nicht ganz frischer Stühle auf Ruhramöben und wegen der Häufigkeit der Halbparasiten-(Darmpassanten-) Cysten im Kote muß ihre Züchtung jedem, der sich mit der Untersuchung und Züchtung der Dysenterieamöbe befassen will, wohlbekannt

sein. Eine Aufzählung der wichtigsten Arten der Darmpassanten des Menschen und die Erklärung für ihren Zusammenhang mit der Rhizopodenfauna des Pferdekotes und des Straßenstaubes geben *Nöller, Krosz und Arndt* 1921.

Diese Halbparasiten sind meist reine Bakterienfresser. Auch größere Bissen wie Flagellaten werden von ihnen nicht verschmäht. Ihre Züchtung ist zunächst aus ganz verschiedenem Ausgangsmaterial von *Frosch* 1897, 1909 auf gewöhnlichem Bakterienagar und mit größerem Erfolge auf dem wasserreicheren „Amöbenagar“ durchgeführt worden. Dieser Amöbenagar ist die Grundlage für die meisten weiteren Züchtungsversuche an den aus Faeces gezüchteten Halbparasiten geworden. Einen anderen Nährboden stellt der nach *Musgrave* und *Clegg* 1904 dar. Die Aussaat des Ausgangsmaterials wird in gleicher Weise wie in der Bakteriologie vorgenommen. Nur empfiehlt es sich, weit größere Mengen auszusäen. Die Amöben folgen dem sich entwickelnden Bakterienrasen. Die Fortzüchtung der Stämme geschieht durch Verimpfen von Material einer amöbenreichen Stelle der Platte oder, wenn es sich um die Trennung verschiedener Arten handelt, durch Übertragung einer einzelnen Amöbe oder einer Cyste auf eine neue Amöbenagarplatte. Die Cystenbildung setzt je nach der Temperatur oder der Art der gezüchteten Amöbe meist nach einer oder mehreren Wochen ein. Platten oder Röhrchen mit Cysten lassen sich bei luftdichtem Abschluß zur Verhütung der gänzlichen Austrocknung monate- oder jahrelang aufheben, ohne daß die Lebenskraft der Amöben dadurch eine Einbuße erleidet.

Durch Aussaat einer einzelnen Bakterienart auf eine Platte gelingt es unschwer, die Begleitbakterien der Originalkultur zu verdrängen, wie *Tsujitani* 1898, *Mouton* 1902 und *Oehler* 1916 gezeigt haben. Durch Abtöten der auf den Nährböden gewachsenen Bakterien und Aufsaat der gleichen Bakterienart mit der Amöbe läßt es sich durch deren Fortkriechen auf Stellen mit toten Bakterien erreichen, daß man die Amöbe dann ohne lebende Bakterien auf neue Platten mit toten Bakterien übersäen und so eine wirkliche Reinkultur erhalten kann. Daß die Bakterien auf der Platte nicht mit den Amöben gleichen Schritt halten können, liegt daran, daß auf der mit der gleichen Bakterienart vorher beschickten Platte diese keinen Platz zur Wucherung mehr finden. Die Literatur über Amöbenzüchtung bis 1911 hat *Wülker* 1911 zusammengestellt.

Die echte Dysenterieamöbe hat allen Versuchen der Züchtung bis vor wenigen Jahren Trotz geboten. Erst *Cutler* (1918 und 1919) hat Kulturen der echten *Entamoeba histolytica* vor sich gehabt. (Die Beschreibung seiner Nährböden findet sich im Abschnitte „Nährböden“.) In seiner Arbeit von 1919 wird die Pathogenität der Kulturen für Katzen erwähnt und festgestellt, daß 0·5% Skatol die Amöben schnell zur Encystierung bringt. Auch *Yoshida* (1918) hat

manche Lebensvorgänge an der Dysenterieamöbe in vitro beobachtet, eine Arbeit, die deshalb Interesse beansprucht, weil der Forscher die Bildung der so charakteristischen Cysten beobachtet haben will.

Die Ernährung der Dysenterieamöbe hat ja das Merkmal, daß die roten Blutkörperchen einen Hauptbestandteil bilden, und ist vielleicht gerade deshalb einer Züchtung noch am ersten zugänglich.

In neuester Zeit hat *Yoshida* 1920 bei der Dysenterieamöbe sowie bei der harmlosen *Entamoeba coli* des Menschen mit Hilfe des Kulturverfahrens in sinnreicher Weise das Ausschlüpfen der Amöben aus der Cyste verfolgt. Aus gewaschenem und filtriertem cystenhaltigem Kot-sedimente werden die Cysten, die ein spezifisches Gewicht von 1·060 bis 1·070 besitzen, durch Zusatz steriler *Mizuamescher* Lösung (Rezept?) auf die Oberfläche gebracht. Die obenstehende Flüssigkeit wird abgehoben, durch Zusatz von destilliertem Wasser wieder auf geringere Schwere gebracht, bis die Cysten untersinken. Nach fünf Minuten langem Einlegen in 1%ige Salzsäure zum Abtöten anhaftender Bakterien und Abzentrifugieren werden die Cysten in Kondenswasser eines Blutagars aus 2 Teilen 2%igem Agar und einem Teile defibriniertem Pferdeblut eingesät. Bei 28—30° schlüpfen die Amöben am 2. und 4. Tage aus.

Bei der *Entamoeba gingivalis* aus dem Munde des Menschen haben *Ohira* und *Noguchi* 1917 die Anfänge der Kultur gesehen, ohne jedoch dauernde Vermehrung zu erhalten.

b) Die Züchtung der parasitischen Flagellaten.

Die Darmflagellaten.

Die Züchtung der Darmflagellaten hat mit der der Amöben manche Berührungspunkte. Sie muß ebenfalls in die Kultur der echten Parasiten und in die der Halbparasiten geschieden werden. Die Halbparasiten sind Flagellaten, welche im Cystenzustande den Darm des Menschen und der Tiere passieren und wegen ihrer saprophytischen Lebensweise im frisch abgesetzten Kote bald ausschlüpfen und sich vermehren. Sie sind Bakterienfresser. Ihre wichtigsten Vertreter gehören zu den Gattungen *Prowazekia* und *Seytomonas* (*Copromonas*) und *Cercomonas*. Ihre Entwicklung in stehendem Harne ist ja in der medizinischen Literatur bei dem „*Bodo urinarius*“ so oft beschrieben worden.

Die Züchtung macht keinerlei Schwierigkeiten. Sie geschieht in flüssigen Nährböden (Bouillon, Kotinfusionen) oder wie bei den Amöben auf Amöbenagar.

Die echten Darmflagellaten scheiden sich in Saprophyten (Bakterien- oder Detritusfresser), in Formen mit osmotischer Ernährung und in Zellektoparasiten. Von der letzten Gruppe liegen noch keinerlei gelungenen Kulturversuche vor. Von den ersten beiden Gruppen oder viel-

mehr von Zwischenformen mit deutlichem Zellmunde und mit der Fähigkeit der Ernährung von feinstem organischen Detritus liegen die gelungenen Versuche an *Trichomonas* und an *Trichomastix* vor.

Trichomonaden des Menschen und der Säugetiere züchtete zuerst *Escomel* 1913 und darauf *Kuczynski* 1914 in Salatbouillon. *Lynch* (1915) gelang die Kultur der menschlichen *Trichomonaden* aus dem Munde und aus der Vagina in saurer Bouillon. *Ohira* und *Noguchi* berichteten 1917 über die Züchtung einer viergeißeligen *Trichomonas* (*Tetratrichomonas*) aus dem Munde des Menschen; als Nährböden gebrauchten sie Ascitesflüssigkeit und Ringerlösung aa. Die Züchtung geschah bei 37°. Die Umimpfung des mit Kapillare aufgenommenen Bodensatzes wurde alle 24 Stunden durchgeführt. *Boyd* (1918) ist die Züchtung von *Trichomonas intestinalis* in unsterilisierter Fäkalsuspension bei 37° bis zur dritten Generation gelungen.

Während bei *Trichomonas* alle Versuche nur zu Mischkulturen geführt hatten, gelang *Chatton* 1918 bei einer *Trichomastix*, die gelegentlich im Blute von Geckos auftritt und als in das Blut eingeschwemmte Darmform aufzufassen ist, die Reinkultur ohne Bakterien auf dem in der Blutflagellatenzüchtung gebräuchlichen *Nicollé-Novy-Neal-Agar*. In einer weiteren Arbeit schildert *Chatton* die Bedingungen und die Ernährungsweise dieses Tieres in Kultur. Mit Hilfe koagulierter Gewebe in aseptischer Autolyse läßt sich den Flagellaten ein zusagender Nährstoff darreichen. Die Flagellaten verlangen etwas Sauerstoff, aber nur sehr wenig. Ihr Luftbedürfnis wird von *Chatton* deshalb als „subanaerob“ bezeichnet. Bei zu hohem Sauerstoffgehalt (an der Oberfläche) kommen sie nicht fort. Die Reaktion der Nährböden soll eine schwach saure sein. Bei 13—22° erreichen die Kulturen ihre stärkste Entfaltung zwischen dem 5. und 8. Tage, bei 37° in 48 Stunden, doch tritt bei dieser letzten Temperatur dann schnelle Degeneration ein. Die kleinsten, festen Teilchen der in aseptischer Nährflüssigkeit (Ascitesflüssigkeit, Bouillon, physiologischer Kochsalzlösung) untergetauchten autolysierten Organstückchen sind für das Wachstum der Flagellaten unentbehrlich, wenn vielleicht auch die Aufnahme gelöster Substanzen eine gewisse Rolle in der Ernährung spielt. Als beste Nährböden dienen Milz- oder Leberstückchen in saurer Bouillon. Eine Erhitzung im Autoklaven auf 120° zum Zwecke der Koagulation der Eiweißbestandteile schadet nicht. Auch auf diese Weise koaguliertes Blut in saurer Bouillon gibt gute Ergebnisse. Auf ca. 12 cm³ Bouillon gibt man etwa 0·5—1·0 g autolysierte Kaninchenleber. Die Röhrchen können mit Paraffinum liquidum überschichtet werden, doch ist das nicht unbedingt nötig.

In neuester Zeit ist auch das darmbewohnende Geißeltier *Chilomastix mesnili* von *Boeck* 1921 mit Erfolg passageweise über fünf Monate bei 37° gezüchtet worden bei einer durchschnittlichen Passage-

dauer von einem oder mehreren Tagen und einer Lebensdauer der Einzelkulturen von durchschnittlich 6—8 Tagen. In physiologischer Kochsalzlösung wurden Verdünnungsstufen flagellatenreichen Stuhls angelegt und in eine sterile Mischung von einem Teile Menschenserum mit 4 Teilen Lockescher Lösung eingesät (Rezept der Lockeschen Lösung: Natriumchlorid 0.9 g, Calciumcarbonat 0.02 g, Kaliumchlorid 0.042 g, Natriumbicarbonat 0.02 g, dest. Wasser 100.0 g und Zusatz von 0.25 g Dextrose). Die Mischung mit dem Menschenserum wurde über Nacht in abgefüllten Mengen von je 5 cm³ im 37°-Brutschranke vor der Beimpfung auf Sterilität geprüft. Überimpfungen mit Platinöse wurden in der ersten Zeit täglich, später in längeren Zwischenräumen vorgenommen.

Die Züchtung der Blutflagellaten und ihrer nächsten Verwandten.

1. Die Trypanoplasmen.

Die Trypanoplasmen oder Cryptobien sind als in das Blut übergewanderte Bodoniden aufzufassen und stellen die nächsten Verwandten der Gattung *Proazekia* dar, deren Züchtung wir schon unter den halbparasitischen Darmbewohnern kennen gelernt haben. Die Blutbewohner sind rein osmotisch sich ernährende Geschöpfe. Da sie, abgesehen von niederen Tieren, bei denen sie teils als Darmparasiten oder Parasiten der Geschlechtswege keine praktische Bedeutung besitzen, nur als die Parasiten des Blutes von Nutzfischen unser Interesse besitzen, ist auch nur hier ihre Züchtung erfolgreich durchgeführt worden. Versuche, sie aus den Geschlechtswegen der Schnecken zu züchten, schlugen bei Kühn 1911 fehl. Ponselle (1913) gibt als erster die Züchtung von *Trypanoplasma varium* aus dem Schlammpeizger *Cobitis barbatula* auf seinem hypotonischen Blutagar bekannt.

2. Die Leishmanien und Leptomonaden aus Wirbeltieren.

Bei kaum einer Protozoengruppe bietet die Züchtung so dankenswerte und praktisch wichtige Aufgaben wie in der *Leishmania*-forschung. Die Leishmanien stellen bekanntlich die Erreger gefährlicher Krankheiten des Menschen, des Hundes und der Katze dar. Ihre Übertragung ist noch unbekannt. Alles deutet darauf hin, daß die Verbreitung ähnlich wie bei den Trypanosomen durch blutsaugende Insekten oder Zecken geschieht. Als Überträger sind verdächtigt worden: Wanzen, Flöhe, Stechmücken der Gattungen *Anopheles* und *Stegomyia*, Psychodiden der Gattung *Phlebotomus*, Gnitzen (*Ceratopogonien*) der Gattung *Forcipomyia*, Stubenfliegen (*Musca domestica*), Zecken verschiedener Gattungen.

Von diesen Gruppen enthalten nun aber mehrere harmlose Insektenparasiten der Gattung *Leptomonas*, die der geißeltragenden

Kulturform von *Leishmania* sehr ähnlich sind, ja ihr teilweise morphologisch so sehr gleichen, daß manche Forscher mit Recht die Einbeziehung der Leishmanien in die ältere Gattung *Leptomonas* oder *Herpetomonas* fordern. Diese große Übereinstimmung hat zu der Ableitung der Leishmanien von Insektenflagellaten geführt und mehr oder minder erfolglose Versuche zur Folge gehabt, auch mit harmlosen Insektenflagellaten Versuchstiere durch Verfütterung oder intraperitoneale Einspritzung infizieren zu wollen (*Fantham* und *Porter* 1916, *Laveran* und *Franchini* 1913, 1914, 1919). Bei der großen Ähnlichkeit oder Gleichheit der einzelnen Leishmanien und Leptomonaden ist hier das Züchtungsverfahren genau wie in der Bakteriologie dazu berufen, die einzelnen Formen morphologisch und kulturell genau zu charakterisieren und auseinanderzuhalten und die Gleichheit oder Verschiedenheit von Leptomonaden aus den als Überträger verdächtigten Insekten darzutun. Das kann nicht nur durch die genaue morphologische Untersuchung der aus Insekten gewonnenen Kulturen geschehen, sondern auch im Tierversuche durch Einspritzung dieser Kulturen bei empfänglichen Versuchstieren.

Die in den leukocytären oder endothelialen Wirtszellen im menschlichen Körper in abgerundeter oder länglich ovaler Gestalt sich findenden Leishmanien wachsen in der Kultur zu typischen geißeltragenden Leptomonaden aus. Ihre Hauptentfaltung haben sie bei der Form der inneren Organe (*Leishmania donovani*) in Milz und Knochenmark und Leber, können aber ab und zu auch im peripheren Blute nachgewiesen und durch das Kulturverfahren gewonnen werden. Bei der Hautform, dem Orientbeuleerreger (*Leishmania tropica* s. *furunculosa*) finden sich die Hauptansammlungen des Parasiten in den Hautgeschwüren, die demnach hier das Ausgangsmaterial liefern müssen.

Die ersten Leishmaniakulturen erhielt *Rogers* 1904 durch Mischen von Milzpunktionsblut eines Kala-Azar-Kranken mit Natriumcitratlösung, die er zur Verhütung der Blutgerinnung zugesetzt hatte. Dieses einfache Verfahren versagte aber in der Mehrzahl der Fälle und es wurden deshalb bald bessere Nährböden eingeführt.

Nicolle zeigte 1908, daß die Leishmanien gut in dem Kondenswasser des Trypanosomenblutagars nach *Novy-Neal* und noch besser in dem von ihm vereinfachten Rezept ohne Pepton und ohne Fleischwasser wachsen; dieser vereinfachte Nährboden hat den Namen Blutagar nach *Novy-Neal-Nicolle* oder kurz NNN-Agar erhalten. An flüssigen Nährböden besonders für die Massenzucht empfehlen *Laveran* und *Pettit* 1910 eine Pepton-Kochsalz-Mischung, die mit gleichen Teilen Kaninchenblut gemischt wird; *Row* (1912) hämolysiert Kaninchenblut mit destilliertem Wasser und gibt nachträglich die Menge Kochsalz zu, die die physiologische Salzkonzentration wiederherstellt.

Nöller hat 1917 die große Überlegenheit des Traubenzuckerpferdeblutagars über den NNN-Agar festgestellt, die bereits *Nicolle* und *Manceaux* 1911 geglückte Züchtung der Leishmanien auf festen Nährböden auf seinem Traubenzucker-Plattenagar (vgl. Tafel III. Fig. 7) systematisch weiterverfolgt und durch Vergleich der Wuchsgeschwindigkeit und der Temperaturanpassung die *Leptomonas* aus dem Hundefloh von den Kala-Azar-Parasiten unterscheiden können.

Das Temperaturoptimum für die Entwicklung der Leishmanienkulturen liegt bei etwa 22°. Die Umimpfung kann bei gut bewachsenen Kulturen in der gebräuchlichen Weise mit der Platinöse vorgenommen werden und wird etwa nach 2—3 Wochen nötig. Die Gewinnung neuer Kulturen macht keine Schwierigkeiten, sofern steriles Blut oder Milzpunktat eines Kala-Azar-Kranken zur Verfügung steht. Bei Orientbeule empfiehlt sich die Verwendung von Material aus einem noch nicht aufgebrochenen Knoten. Aber selbst bei schon stark verunreinigten aufgebrochenen Geschwüren konnte *Wenyon* 1912 Reinkulturen gewinnen, wenn er das Geschwür mit Alkoholäther desinfizierte und dann das Material mit einer in den Geschwürsrand eingepohrten Kapillare entnahm.

Was den Ersatz des meist bei den Nährböden gebrauchten Kaninchenblutes anlangt, so liegen die verschiedensten Angaben vor. *Nicolle* und *Laveran* wollen beim NNN-Agar mit Pferdeblut schlechte Ergebnisse gehabt haben (nach *Laveran* 1917). Nach *Cristina* und *Cannata* (1910) übertrifft das Hundeblut noch das Kaninchenblut. *Cornwall* und *La Frenais* (1916) wollen bei *Leishmania donovani* mit Kaninchenblut viel bessere Ergebnisse erzielt haben als mit Schafblut, Ziegenblut, Meerschweinchenblut und selbst Hunde- und Menschenblut. Nach *Archibald* (1914) hindert Schafblut die Entwicklung von *L. donovani*, nicht aber die von *L. tropica*. Nöller hat mit Traubenzucker-Pferdeblut-Agar bei beiden *Leishmania* arten viel bessere und üppigere Kulturen erzielt als mit NNN-Kaninchenblutagar und besonders 1917 mit dem mit Pferdeblut gemischten Plattenagar, so daß er das leicht durch Aderlaß in großer Menge steril zu gewinnende Pferdeblut dem teuren Kaninchenblute für überlegen hält, wenigstens bei Verwendung seiner Traubenzuckeragarrezepte.

Daß alle Blutflagellaten aerob gezüchtet werden, sei hier besonders hervorgehoben. Vielleicht ist das gute Gedeihen bei Sauerstoffzutritt auch der Grund für das ganz vorzügliche Wachstum auf Platten.

Von *Leishmania* ähnlichen Flagellaten verdient die Züchtung bei den folgenden hervorgehoben zu werden:

Leptomonas spec. aus dem Gecko *Tarentola mauritanica* in den Mittelmeerländern und in Nordafrika wurde von *Sergeant*, *Lemaire* und *Senevet* 1914 durch die Kultur entdeckt und für identisch mit der *Leishmania tropica* gehalten, die im Gecko

ein Virusreservoir für die menschliche Erkrankung besitzen und durch Phlebotomen übertragen werden sollte. *Chatton* hat 1918 die Kulturen mit denen der *Leishmania tropica* verglichen und geringfügige Unterschiede festgestellt.

3. Insektenleptomonaden.

Die Flagellaten aus Insekten lassen sich selbst in flüssigen Nährböden in Reinheit züchten, sofern der Insektendarm einigermaßen bakterienfrei ist. Dies ist bei Flöhen in der Regel der Fall. Bei Stechmücken sind ziemlich regelmäßig beträchtliche Mengen von Bakterien vorhanden. In diesem Falle ist das Blutagarplattenverfahren zur Gewinnung oder Reinigung der Stämme unentbehrlich. Die Einzelheiten werden unter Trypanosomenzüchtung beschrieben. Der möglichst aseptisch herauspräparierte Insektendarm wird mehrfach in steriler Bouillon oder in steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zwischen sterilem Objektträger und sterilem Deckglase zerpreßt; die Flüssigkeit wird mit Spritze aufgesogen und auf die Platten verteilt oder bei starkem Bakterienwachstum noch weiter verdünnt. Nähere Einzelheiten finden sich bei *Nöller* 1917. Die wichtigsten gezüchteten Insektenflagellaten sind:

Leptomonas fasciculata *Novy, Neal und Torrey* 1907 (nicht *Leger* 1902!). Von *Novy* und seinen Mitarbeitern 1905 aus Stechmücken zunächst in Mischkultur mit einem Bakterium gezüchtet, mit *Knapp* 1906 durch die Anwendung des Plattenverfahrens gereinigt. Von *Mesnil* 1912, *Fränkel* 1909 und *Nöller* 1917 untersucht. Wächst von allen Trypanosomiden am üppigsten und läßt sich sogar auf blutfreien Nährböden (in Bouillon und auf Agar) züchten.

Leptomonas ctenocephali *Fantham* 1912 = *L. pseudoleishmania* *Brumpt* 1913. Dieser weitverbreitete Parasit des Hunde- und Katzenflohes hat als angebliche Entwicklungsform des Kala-Azar-Parasiten in den Mittelmeerländern eine große Rolle gespielt. Die Reinzüchtung einer nahe verwandten, wohl der gleichen Form aus dem Menschenfloh gelang *Wenyon* 1912 und 1913 aus dem eingetrockneten Kote eines infizierten Flohes. *Nöller* gewann 1914 zunächst unreine Kulturen des Parasiten des Hundeflohes, dessen Enddarm er zerquetscht und in das Kondenswasser von Blutagarröhrchen eingesät hatte.

Dann gelang ihm bei Verdünnung des Aussaatmaterials und Verteilung auf mehrere Röhrchen in gleicher Weise die Reinkultur, über deren verblüffende Lebensfähigkeit in den Kulturen er 1917 berichtet. In dieser Arbeit beschreibt er auch die Gewinnung der Einzelkolonien unmittelbar nach Aussaat des zerpreßten Flohdarmes auf die Platten. Durch ihr langsames Wachstum und durch ihr besseres Wachstum erst bei 30° läßt sie sich scharf von den Leishmanien unterscheiden.

Chatton hat die Form 1919 gleichfalls gezüchtet und weist auf die von den Leishmanien verschiedene gedrehte, flache Gestalt des Tieres hin, die dem Verfasser schon 1914 auffiel und die er seither an allen seinen weiteren Stämmen hat nachweisen können.

Laveran und *Franchini* haben 1919 ebenfalls Reinkulturen gewonnen. Während *Nöller* bei Einspritzung bei gesunden Mäusen 1917 keine Infektion erzielen konnte, wollen *Laveran* und *Franchini* 1919 bei Verwendung junger Mäuse einige einwandfreie Ergebnisse erzielt haben. Aus ihren Arbeiten ist aber noch nicht recht ersichtlich, ob es sich um eine dauernde oder um eine nur vorübergehende Lebenderhaltung in den Organen der Maus handelt.

Da die Sorgfalt der Beobachtung und der Beschreibung der Befunde nach modernen cytologischen Methoden nicht in dem Maße bei *Laveran* und *Franchini* festzustellen sind, wie es die Wichtigkeit dieser Frage erfordert, so müssen alle die vielen angeblich positiven Infektionsversuche dieser beiden Forscher mit Vorsicht aufgenommen und erst weiter nachgeprüft werden, unsomehr als bei Nachprüfungen von anderen Forschern die Ergebnisse stets negativ waren (*Tyzzer* und *Walker* 1919, *Hoare* 1921, eigene Versuche).

Bei den Insektenflagellaten der Gattung *Leptomonas* aus nicht blutsaugenden Insekten, aus Mollusken und aus einem Wurme liegen positive Züchtungsergebnisse nur bei *Lept. jaculum* aus dem Wasserskorpione *Nepa cinerea* vor (*Laveran* und *Franchini* 1919).

Die Züchtung soll auf indirektem Wege durch Herauszüchten aus den Organen einer mit dem Geißeltier gespritzten Maus gelungen sein. Die Bestätigung dieser Angabe bleibt abzuwarten. Freilich scheint mit Blutparasiten aus dem Überträgerdarme dieses Verfahren möglich, wie *Maggio* und *Rosenbusch* 1915 bewiesen haben. Doch sind diese parasitischen Flagellaten gegen parenterale Verdauung geschützt, was bei den nicht an Wirbeltiere angepaßten Flagellaten kaum der Fall sein dürfte.

4. Die Züchtung der Trypanosomen und Crithidien.

Gegenüber den Leptomonaden und Leishmanien zeichnen sich die Crithidien und die Trypanosomen durch die starke Ausbildung einer undulierenden Membran aus. Das die freie Geißelspitze tragende Ende wird als Vorderende bezeichnet. Ist die undulierende Membran nur vor dem Kerne vorhanden, d. h. liegt der das Hinterende der Geißel bezeichnende Blepharoplast vor dem Kerne, so entsteht der Gattungstyp *Crithidia*. Rückt der Blepharoplast über den Kern hinaus in das Hinterende der Zelle, so entsteht der Gattungstyp *Trypanosoma*. Die Vertreter der Gattung *Trypanosoma* sind durchgehend Parasiten des Blutes von Wirbeltieren, die der Gattung *Crithidia* vorwiegend Darmparasiten von blutsaugenden Gliedertieren oder

Würmern. Nur eine geringere Zahl von Arten kommt im Darne nicht blutsaugender Wanzen vor. Die Zusammenhänge zwischen beiden Gattungen sind ebenso eng wie zwischen *Leishmania* und *Leptomonas*, und die scharfe Trennung der Gattungen ist infolge der häufigen Übergänge der einen Form in die andere beim Wechsel der Lebensbedingungen nicht berechtigt. Während der eigentliche Trypanosomentyp im Blute vorherrscht oder meist sogar konstant zu finden ist, tritt bei der Entwicklung der nämlichen Form im Überträger in größerer oder geringerer Ausdehnung der Crithidientypus auf. Das gleiche ist in den Kulturen unter manchen Bedingungen der Fall.

Infolge dieser interessanten Verhältnisse bildet gerade bei den Forschungen im Gebiete der Crithidien und der Trypanosomen das Kulturverfahren ein ganz wertvolles Mittel zur Aufklärung vieler Fragen. Bei der Fülle der Trypanosomenarten, bei ihrer im Blute häufig wechselnden Gestalt ist es schwer, die einzelnen Tiere sicher zu trennen. In der Züchtung auf gleichbleibenden Nährböden können wir die einzelnen Arten, die sich vielleicht im Blute ihres Wirtes nur spärlich finden oder die mikroskopisch überhaupt nicht nachweisbar sind, in großer Menge bequem vergleichend untersuchen und vielleicht auch schon durch ihre Wuchsform manche Arten makroskopisch trennen. Bei der großen Ähnlichkeit von Insektencrithidien mit Trypanosomenentwicklungsformen kann die Züchtung von Flagellaten aus den als Überträger verdächtigten Insekten den Beweis sowohl durch den Vergleich mit den betreffenden Trypanosomenkulturen schon durch das rein morphologische Studium ermöglichen oder durch Einspritzung der gewonnenen Kulturen bei nicht infizierten Wirtstieren des betreffenden Trypanosomas. Den interessanten Änderungen der Form kann man *in vitro* durch Abänderung der Bedingungen näher nachspüren. Auch die die Vermehrung bedingenden Faktoren, deren Kenntnis wertvolle Aufschlüsse über das Wesen der Trypanosomeninfektion beim Wirbeltiere, über die Ursachen der Vermehrungs- und Remissionsperioden und die Rezidive geben kann, lassen sich auf dem Wege der Züchtung ermitteln.

Da sich die Gewinnung großer Mengen reiner Trypanosomensubstanz ebenfalls durch die Kultur ermöglichen läßt, so kann auch die Durcharbeitung der Serologie und der Immunitätsforschung mit Erfolg in Angriff genommen werden.

Die ersten Züchtungsversuche bei Trypanosomen stammen von *Danilewsky*, der um 1886, 1888 und 1889 bei den Frosch- und Vogeltrypanosomen zuerst eine Vermehrung der aus dem Blute genommenen Formen beobachtet hatte. Er hatte das trypanosomenhaltige Blut stehen lassen oder in feinen Glaskapillaren ohne weitere Zusätze aufbewahrt und dabei einen Übergang der Blutformen in die kleinen Kulturformen beobachtet, aufs sorgfältigste beschrieben und die Bedingungen der Vermehrung erwogen. Diesen Anfängen folgte erst 1903 durch *Mc Neal* und *Novy* die wirkliche Lösung der Kulturfrage bei dem Ratten-

trypanosoma, das im Kondenswasser von Kaninchenblutagar nicht nur gezüchtet, sondern auch in vielen Generationen weiter gehalten werden konnte. Dem Rattentrypanosoma folgten bald das *Tryp. brucei* (1903) und zahlreiche Vogeltrypanosomen. Fischtrypanosomen, die der Frösche und die meisten noch übrigen Trypanosomen der Säugetiere wurden in der Folgezeit teils von den gleichen Forschern, teils von anderen Autoren in Kultur gewonnen. Ein wesentlich anderer Nährboden, nämlich die Trypanosomenblutbouillon, diente *Myajima* 1907 zur Züchtung des weitverbreiteten Rindertrypanosomas und *Irikura* 1907 zur Kultur verschiedener Trypanosomen. Dieser einfache Nährboden hat sich in der nächsten Zeit auch bei anderen Trypanosomen bewährt. Bei den zahlreichen Versuchen hat man allmählich die Trypanosomen nach der Schwierigkeit ihrer Züchtung einteilen gelernt. An die bloßen Züchtungsversuche haben sich Arbeiten über die Ursachen der Vermehrung der Trypanosomen in den Nährflüssigkeiten angeschlossen, von denen die von *Robertson* 1911, *Ponselle* 1913, *Nöller* 1913, *Ponselle* 1917 und 1919 anzuführen sind. Über die Ursachen der verschiedenen Formen in den Kulturen und im Blute liegen die Arbeiten und Erwägungen von *Delanoe* 1911, *França* 1911, *Nöller* 1913 und 1920 und von *Ponselle* 1919 vor.

Der Züchtung in flüssigen Nährböden ist wie bei den Leishmanien die Plattenkultur gefolgt, bei der *Nöller* 1917 die ganz charakteristische Wuchsform mehrerer Arten feststellen und mit Hilfe der reinen Trypanosomensubstanz Versuche über serologisches und Immunitätsverhalten des Froschtrypanosomas anknüpfen konnte, nachdem *Mendelejeff-Goldberg* 1913 am gleichen Objekte ähnliche Versuche durchgeführt hatte.

Die angegebenen Nährböden sind zum größten Teile flüssig; die Platten des Trypanosomenagars zeichnen sich auf ihrer Oberfläche durch große Feuchtigkeit aus. Das Wachstum erfolgt entweder im Kondenswasser beim Blutagar, auf der Oberfläche der Blutkörperchenschicht in den Blutbouillonröhrchen oder auf der feuchten Oberfläche der Blutagarplatten. Der Agar der Nährböden dient wohl in erster Linie als formgebendes Medium. Die eigentliche Nährflüssigkeit besteht aus einer Mischung von Blut oder Serum und Nährbouillon, der zur Verbesserung der Ergebnisse noch Traubenzucker zugesetzt sein kann.

Die Beimpfung geschieht mit dem trypanosomenhaltigen Blute, das steril entnommen sein muß. Bei Einsaat in das Kondenswasser von Blutagarröhrchen genügen 1—3 Tropfen. Größere Mengen vermeide man, weil sonst im Falle der nachträglichen Gerinnung das ganze Kondenswasser einen Gerinnungsbezirk bildet, der die Trypanosomenentwicklung verhindert, und weil auch aus dem Blute zuviel Antistoffe mit übergeführt werden. Bei Einsaat größerer Mengen empfiehlt es sich, das Blut vorher durch Schütteln mit Glasperlen zu defibrinieren. Das muß z. B. unbedingt geschehen, wenn die Trypanosomen in *Myajima*-

scher Blutbouillon gezüchtet werden sollen. In geronnenen Röhren tritt hier keinerlei Wachstum ein. Bei der Aufsaat auf Platten können auch genau wie bei den leicht züchtbaren Bakterien bei den leichter züchtbaren Trypanosomen durch auf die Platten verstrichenen Ausgangsblut Einzelkolonien unmittelbar gewonnen werden (Nöller 1917, *Froschtrypanosoma* und 1920 unveröffentlicht *Schizotrypanum*).

Die Blutformen der Trypanosomen gehen in den Kulturflüssigkeiten in eine meist kleinere, manchmal aber auch größere (*Schizotrypanum*!) Kulturform mit *Crithidia*-, ja teils auch mit *Leishmania*-Charakteren über und vermehren sich lebhaft unter Beharrung auf dieser Schwärmform. Je nach der Temperatur und der Ergiebigkeit des Nährbodens nehmen bald weniger einheitliche Degenerations- und Involutionsformen mit vakuolig gebautem Protoplasma und Neigung zur Abkuglung überhand und es wird höchste Zeit, die Umimpfung vorzunehmen. Diese wird in der gleichen Weise wie in der Bakteriologie am einfachsten mit einer nicht zu kleinen Öse vorgenommen. 3 Ösen Material einer genügend bewachsenen Kultur genügen in der Regel zur Erzielung einer Subkultur. Wegen der Gefahr des Verlustes der Stämme bei bakterieller Verunreinigung sind stets mehrere Röhren gleichzeitig anzulegen. Bei der Züchtung der *Crithidien* oder der Trypanosomenentwicklungsformen aus dem Darmsaft blutsaugender Insekten wird das Blutagarplattenverfahren angewendet und in gleicher Weise verfahren wie bei den Insektenleptomonaden. Durch Nöller (1916 und 1919) sind auf diese Weise die Entwicklungsformen des Rinder- und des Schaftrypanosomas aus den Überträgern gezüchtet worden und durch Vergleich mit den Kulturen aus dem Blute als identisch erwiesen worden.

Durch Benutzung des Blutagarplattenverfahrens konnte Nöller 1921 (Vortrag im Tropeninstitute Hamburg, Bericht noch nicht veröffentlicht) auch die hämolytische Wirkung einiger Vogeltrypanosomen (*Kreuzschnabeltrypanosoma*, *Hühnerhabichtstrypanosoma*) nachweisen, die auf den Platten genau wie die hämolytischen Streptokokken das Hämoglobin im Umkreis ihrer Kolonien lösen und so den Nährboden durchsichtig machen können. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Hämolysewirkung auch im Wirtsorganismus eine Rolle spielt.

Da wir es sowohl bei den Nährböden der Trypanosomen wie bei den in den Kulturen auftretenden morphologischen Änderungen mit recht komplizierten Gemischen und Vorgängen zu tun haben, müssen wir die einzelnen Bestandteile und Faktoren einzeln etwas näher behandeln.

Die Temperatur.

Die Kaltblütler- und die leicht züchtbaren Vogel- und Säugetiertrypanosomen werden sowohl bei der Gewinnung der Stämme wie auch bei der Fortzüchtung bei Zimmertemperatur gehalten. Von den etwas

schwieriger züchtbaren Säugetiertrypanosomen empfiehlt sich bei Schizotrypanum und bei dem Schaftrypanosoma die Haltung bei mindestens 28—30°. Bei Zimmertemperatur bleiben nämlich z. B. alle mit infiziertem Schafblute besäten Blutbouillonröhrchen noch nach 10 Tagen steril, während die bei 30° gehaltenen Parallelröhrchen bereits nach 7 Tagen üppiges Wachstum zeigen. Bei der Plattenkultur muß wegen des naturgemäß schnelleren Wachstums und des schnelleren Sichtbarwerdens der Kolonien tunlichst die höchste, ein schnelles Wachstum zulassende Temperatur angewendet werden. Das ist etwa 30°. Bei der Bluttemperatur selbst scheint wegen der stärkeren Wirkung der Antistoffe hie und da ein weniger günstiges Ergebnis erzielt werden zu können. Naturgemäß erfordert die Haltung bei höherer Temperatur eine viel größere Sorgfalt und Aufmerksamkeit, weil bei diesen Temperaturen die Degeneration viel schneller eintritt als bei niederen Temperaturen. Sobald deshalb die Stämme einmal gut angezüchtet sind, wird man sie vorteilhaft bei der niedrigsten, ihnen eben noch zusagenden Temperatur halten. Bei allen Trypanosomen aus Säugetieren und Vögeln empfiehlt sich aber unbedingt auch eine Prüfung des Verhaltens der Stämme bei Bluttemperatur. So wächst das Kreuzschnabeltrypanosoma *Tr. loxiae* nach Nöller 1920 bei 37° nicht wie bei Zimmertemperatur in Crithidiaform, sondern ebenso wie im Vogelblute in der Form echter Trypanosomen. Das gleiche ist nach Trautmann 1920 (angeführt bei Nöller 1920 und Trautmann 1921) bei dem Rindertrypanosoma *Tr. theileri* der Fall. Bei diesen Arten kann also bei gleichbleibenden Nährböden eine so verschiedene Form erzielt werden, wie wir sie teilweise im Blute einerseits und im Überträger des Trypanosomas anderseits zu sehen gewohnt sind. Da ceteris paribus der Übergang in die Trypanosomenform hier lediglich der gesteigerten Temperatur zugeschrieben werden muß, so können wir mit großer Wahrscheinlichkeit den Grund für die höhere Ausbildung der undulierenden Membran in der durch die Wärme stark beschleunigten Geißelbewegung suchen.

Die Umwandlung von der Crithidiaform in die Trypanosomenform bei Brutschrankzüchtung beobachtete und beschrieb Nöller bereits 1920 bei den Vogeltrypanosomen aus dem Hühnerhabicht und dem Waldkauz sowie in nicht so regelmäßiger Folge nach der Temperaturerhöhung bei einem Trypanosoma der Lewisigruppe, dem Hamstertrypanosoma *Tr. rabinowitschi* (= *Tr. ericeti*). Die gleiche Erscheinung beschreibt Nieschulz 1921 von zahlreichen weiteren Vogeltrypanosomen.

Das Blut in den Nährböden.

Bei allen gelungenen Züchtungen hat sich der Zusatz von Blut zu den Nährböden als unentbehrlich herausgestellt. Die leicht züchtbaren Arten wachsen schon in Nährböden, die nur 10—30 % Blut enthalten, die pathogenen dagegen verlangen einen Blutzusatz von 50—70 % des

Nährbodens. Im unverdünnten Blute hat sich bis jetzt bei keiner Art eine Passagenzüchtung erfolgreich durchführen lassen, obgleich bei einigen leicht züchtbaren Tieren die Anfänge der Vermehrung im stehenden, unverdünnten Blute beobachtet werden konnten. Das deutet darauf hin, daß das Blut alle Bestandteile enthält, die zum Leben der Trypanosomen nötig sind, daß es aber auch nicht frei von hemmenden Substanzen ist. Die nötigen Bestandteile sind alle im Serum enthalten, denn *Behrens* konnte 1914 das *Tr. brucei* auch auf hämoglobinfreiem Serumagar züchten. Das gleiche gelang dem Verfasser bei *Trypanosoma theileri*. *Ungermann* konnte 1918 wenigstens eine lange Lebensdauer bei den pathogenen Trypanosomen im Serum feststellen. Daß mit unverdünntem Blute keine Ergebnisse erzielt werden konnten, während die gebräuchlichen Nährböden gute Ergebnisse liefern, hat verschiedene Ursachen: Da weder das Hämoglobin noch das Fibrin eine Rolle spielen, weil die blutkörperchenfreien oder die mit defibriniertem Blute hergestellten Nährböden ganz die gleichen guten Ergebnisse liefern, muß die Ursache im Serum allein gesucht werden.

Dieses besitzt nun tatsächlich in der Regel Eigenschaften, die für die Trypanosomen nicht gleichgültig sind. Fast alle Sera besitzen im aktiven Zustande Lysine, die im unverdünnten Zustande bei 0.5 cm^3 Serum hinreichen können, eine Öse Trypanosomensubstanz vollkommen abzutöten. Besonders das Meerschweinchenserum zeichnet sich durch hohen Gehalt an solchen Substanzen aus. Deren Wirkung wird nun in den Nährböden durch Verdünnung verringert, durch Mischen mit Agar, dessen komplementbindende Wirkung ja bekannt ist, oder am besten auch noch durch Erhitzen aufgehoben, ein Verfahren, das *Mathis* 1906 empfiehlt, der die guten Ergebnisse mit den erhitzten Nährböden hervorhebt. Im inaktiven Zustande sind die Sera durch ihre agglutinierenden Eigenschaften zwar weniger gefährlich, können aber doch unter Umständen durch starke Agglutination der Kulturformen bei morphologischen und serologischen Untersuchungen empfindlich stören. Es ist eine Aufgabe der Zukunft, die zu den Nährböden gebrauchten Blutarten gegenüber allen gezüchteten Trypanosomenarten in diesen Richtungen systematisch zu untersuchen. Bis jetzt liegen in dieser Richtung erst Anfänge vor (*Nöller* 1917, *Froschtrypanosoma* und *Trautmann* 1921, *Rindertrypanosoma*).

Unter den Blutarten zur Nährbodenherstellung hat das Kaninchenblut lange die führende Rolle gespielt, weil es in dem wenig erhitzten, bei 45° gemischten Blutagar für die Züchtung der Rattentrypanosomen in der Tat recht gut brauchbar ist. Bei den weiteren Versuchen, das nur in geringer Menge zu gewinnende Kaninchenblut durch eine andere leicht durch Aderlaß in großer Menge steril zu gewinnende Blutart zu ersetzen, hatte *Nöller* 1913 mit Schaffblut bei der Züchtung der Frosch- und Rattentrypanosomen gute Ergebnisse gehabt, *Hagemeister* 1914 bei Traubenzuckerzusatz bei den Naganatrypanosomen mit Pferdeblut.

Diese letzte Zusammenstellung hat Nöller 1917 selbst bei Züchtung auf Platten so vorzügliche Ergebnisse bei zahlreichen nichtpathogenen Trypanosomen und bei *Schizotrypanum* geliefert, daß die Verwendung des teuren und unbequemen Kaninchenblutes als überflüssig bezeichnet werden muß, wenigstens was die untersuchten Trypanosomen anlangt.

Der Agar.

Der Agar bildet für die Züchtung der Trypanosomen einen unentbehrlichen Bestandteil nur bei der Plattenkultur, denn die festen Nährböden setzen naturgemäß ein geeignetes Versteifungsmedium voraus. In diesem Falle muß aber der Agar auf seiner Oberfläche feuchter sein als die Bakteriennährböden im allgemeinen. Eine genügende Festigkeit einerseits und ein genügender Feuchtigkeitsgehalt läßt sich bei Mischung gleicher Teile eines 1%igen Agars mit defibriniertem Blute erzielen (Plattenagar nach Nöller 1917), aber nur dann, wenn der Agar möglichst wenig gekocht und sterilisiert wird. Sonst büßt er seine Festigkeit besonders bei Haltung im Brutschranke ein. Die Festigkeit muß nämlich eine so große sein, daß die Platten in umgedrehtem Zustande gehalten werden können, weil nur so die überschüssigen Kondenswassermengen ablaufen. Würden die Platten nicht umgedreht werden, so müßte das Kondenswasser auf der Oberfläche stehen bleiben und an ein Aufgehen einzelner Kolonien wäre nicht zu denken. Um bei diesem Verfahren die Verschmutzung der untenstehenden Deckelschale und den Feuchtigkeitsverlust des Nährbodens zu verhindern, bekommt sie eine Füllung mit 2%iger Sublimatlösung. Diese muß besonders in den ersten Tagen und bei höherer Temperatur öfters gewechselt werden (Baden der Platten!).

Bei der Röhrenkultur der Trypanosomen im Kondenswasser von Blutagar dient der Agar wohl in erster Linie als Komplementinaktivator und -vernichter bei der Mischung mit dem Blute. Ernährende Funktionen kommen ihm nicht zu. Sein Gehalt in dem Ausgangsagar richtet sich nach dem Verhältnisse, in dem er mit Blut gemischt werden soll. Es genügt im allgemeinen, wenn die fertige Blutagarmischung 1% Agar enthält. Bei genügender Festigkeit wird dann in den Röhren genug Kondenswasser abgeschieden.

Szent-Györgyi 1920 (Vortrag über Kolloidchemie in der Medizin im Tropeninstitute, Hamburg) ist geneigt, dem Agar auch noch die Aufnahme diffusibler gelöster Exkretionsstoffe der gezüchteten Kleinlebewesen zuzuschreiben und erklärt durch diese Art der Reinigung der Wachstumsstelle die große Überlegenheit des Agarplattenverfahrens in der Bakteriologie gegenüber der Züchtung in Bouillon. Gerade bei der Trypanosomenzüchtung dürfte diese Erklärungsweise die große Überlegenheit des Plattenverfahrens zur Gewinnung großer Trypanosomenmengen gut erläutern.

Die Nährflüssigkeiten zur Agarbereitung oder zur unmittelbaren Mischung mit dem Blute.

Wie in der Bakteriologie spielt die Nährbouillon in der gebräuchlichen Herstellung aus Fleisch, mit dem üblichen Kochsalzzusatz von 0.5% und einem Peptongehalte von 1% die führende Rolle als Nährbodengrundlage. Die älteren Rezepte sprechen regelmäßig von Rindfleischbouillon. Der Krieg hat gezeigt, daß das Pferdefleisch eine mindestens gleichwertige Grundlage bildet, und alle anderen Fleischarten dürften sich ähnlich verhalten. Eine gleichwertige Nährbouillon liefert auch die mit *Liebigs* Fleischextrakt in gebräuchlicher Weise hergestellte Bouillon und die nach den Angaben von *Szasz* 1915 bereitete Bouillon aus Blutkuchen, deren Kochsalzgehalt schon ohne besonderen Zusatz hinreicht und deren Klärung besonders gut durch Ansäuerung mit je 2 cm³ Normalsalzsäure auf 100 cm³ der durch Tuch filtrierten Flüssigkeit und nochmaliges Aufkochen erzielt werden kann. Durch Neutralisieren mit Normalnatronlauge wird der Säureüberschuß beseitigt.

Die Reaktion der Nährflüssigkeiten liegt am besten um den Neutralitätspunkt. Sowohl schwach saure wie schwach alkalische Flüssigkeiten geben gute Ergebnisse. Der Salzgehalt soll etwa dem des Blutes entsprechen.

An Abänderungen sind einfachere Flüssigkeiten angewendet worden, wenn es sich um die Züchtung leicht wachsender Trypanosomen handelte, u. zw. Peptonwasser von *Prowazek* 1912 bei der Züchtung des Hühnertrypanosomas und Wasser von *Ponselle* 1913 als Lösungsmittel des Agars zur Erzeugung hypotonischer Nährflüssigkeit für die Züchtung von Fischtrypanosomen. Bei der Überlegenheit der peptonhaltigen Gemische ist anzunehmen, daß die Peptone assimiliert werden. In gleicher Weise sollten Glykokoll und Asparaginsäure wirken, deren Zusatz *Mc Neal* und *Novy* 1903 empfohlen und wohl auch der Traubenzucker, dessen vorzügliche Wirkung ganz auffällig ist und dessen Wirkung zugleich mit Elektrolytgehalt und Säuregrad eine besondere Besprechung finden muß.

Daß selbst bei der Züchtung schwer wachsender Trypanosomen unter Umständen Ersatzflüssigkeiten brauchbar sind, bewies *Behrens* 1914, der eine Abkochung von Erbsenbrei mit Erfolg bei der Züchtung des Naganatrypanosomas benutzen konnte.

Die osmotischen Eigenschaften der Nährlösungen.

Während man früher allgemein darnach gestrebt hatte, die Nährlösungen in ihrem Salzgehalt und mithin in ihren osmotischen Eigenschaften dem Blute möglichst gleich zu gestalten, zeigte *Robertson* 1911, daß die Trypanosomen des Goldfisches, die sich in dessen Blute nach

Ablauf der frischen Infektion nicht mehr vermehren, zur Teilung schritten, sobald sie dem Blute etwas Wasser zusetzte. Sie sieht in der Tonussenkung und in der dadurch bedingten Wasseraufnahme den Anreiz zur Vermehrung. Die die Kultur bedingenden Faktoren waren mit dieser Angabe bei einem Trypanosoma zum ersten Male näher festgestellt worden. *Ponselle* hat diese Forschungen 1913 in seinem hypotonischen Blutagar zur Züchtung der Fischtrypanosomen praktisch verwertet. *Nöller* hat 1913 das Froschtrypanosoma in der gleichen Richtung untersucht, konnte sich bei dieser Form aber von der teilungsanregenden Wirkung der Tonussenkung nicht überzeugen und erwog auch die Frage, inwieweit ein Wasserzusatz etwa im Sinne einer Verdünnung von im Blute vorhandenen wachstumshemmenden Stoffen wirken könnte.

Bei allen Trypanosomen der Wirbeltiere von den Amphibien aufwärts konnte bis jetzt bei keiner Art die Tonussenkung als alleinige Ursache des Überganges und des Wachstums in der Kulturform erwiesen werden. Bei den Säugetiertrypanosomen werden deshalb nach wie vor die Nährflüssigkeiten möglichst auf den gleichen Tonus gebracht wie das Blut.

Was die Wichtigkeit der einzelnen Salze für das Leben der Trypanosomen anlangt, so hat diese für die Züchtung hochwichtige Frage noch nicht genügend Aufmerksamkeit gefunden. Über die Wirkung der einzelnen Salze auf die Naganatrypanosomen liegt aus neuerer Zeit die Arbeit von *Simons* 1918 vor.

Der Säuregrad der Nährflüssigkeit nach der Mischung mit Blut.

Die Tatsache, daß das Froschtrypanosoma durch bloßen Wasserzusatz oder durch Kochsalzzugabe zum infizierten Blute nicht zur Vermehrung gebracht werden konnte, wohl aber durch Zusatz von Blutbouillonabguß (*Nöller* 1913), gab *Ponselle* Veranlassung, die sauren phosphorsauren Salze der Blutbouillon in ihrer Rolle etwas näher zu untersuchen. Er stellt 1917 und 1919 fest, daß die Blutbouillon nach *Myajima* und das Kondenswasser des fertigen Blutagars nach *Novy* und *Mc Neal* in ihrem Säuregrade ganz übereinstimmen und daß der wohl durch die sauren phosphorsauren Salze bedingte Gehalt an Wasserstoffionen der *Sörensen-Ziffer* $P_{\frac{1}{10}}$ (Sör.) = 5.6 entspricht. Er hat mit einem physiologischen Salzgemische mit gleichem Säuregrade die Teilung beim Froschtrypanosoma erzeugen können und sieht in dem Übergange in ein schwach saures Medium die Ursache für die Vermehrung in der Kulturform, in einem Übergange in ein schwach alkalisches Medium den Grund für das Zustandekommen der Trypanosomenform. Wenn dem Säuregrade auch zweifellos eine große Bedeutung zugemessen werden muß, so sind die Folgerungen *Ponselles* in dieser

allgemeinen Form sicher zu weitgehend, besonders die letzte Folgerung, nachdem Nöller 1920 beim Kreuzschnabeltrypanosoma experimentell die Überführung der Crithidien- in die Trypanosomenform durch bloße Erhöhung der Temperatur auf den gleichen Nährboden gelungen ist. Es sind eben für die einzelnen Erscheinungen nicht einzelne Ursachen verantwortlich, sondern meistens mehrere und manchmal ganze Komplexe.

Die Rolle des Traubenzuckers.

Der Traubenzucker (Dextrose, Glucose) scheint für die Kultur der Trypanosomen und Leptomonaden eine große Rolle zu spielen. Biot C., Biot R. und Richard hatten 1911 beobachtet, daß in Rattenkadavern die Trypanosomen in der Leber am längsten leben und schrieben die Ursache hierfür dem Traubenzuckergehalte des Leberblutes zu. Daß in der Tat Leberextrakte das Überleben der Trypanosomen begünstigen, hatte Schern 1911 in einer ausführlichen Arbeit gezeigt. Biot C., Biot R. und Richard 1911 konnten nun in der Tat zeigen, daß Traubenzuckerzusätze zum Trypanosomenblute die Lebensfähigkeit in vitro auf die doppelte Zeit ausdehnen und sind geneigt dem Traubenzucker geradezu trophische Funktionen zuzuschreiben. Fleig 1911 bestätigt die Ansicht der Forscher. Johns konnte 1914 bei Zusatz von einer 1%igen Traubenzuckerlösung zum Rinderblute Teilung des Rindertrypanosomas und das Entstehen der Kulturformen beobachten. Praktisch verwertet hat die günstige Rolle des Traubenzuckers Hagemeister 1914, der zeigte, daß im Blutagarröhrchen mit Traubenzucker sich gewisse Ergebnisse bei der Züchtung des *Trypanosoma brucei* erzielen lassen, und Nöller 1917 hat die Überlegenheit der traubenzuckerhaltigen Nährböden an zahlreichen Blutflagellaten bewiesen.

Vielleicht spielt der Traubenzucker, der ja als Hemmungsmittel für manche Fermente bekannt ist, neben seiner Ernährungsfunktion auch noch eine Rolle als Komplementhemmer in den Blutnährböden.

Spezielles über die Züchtung der verschiedenen Trypanosomenarten.

In der Einteilung der Trypanosomen ist eine große Verwirrung dadurch entstanden, daß häufig rein praktische, nicht im Bau des Parasiten begründete Einteilungsprinzipien bei der Aufstellung der Systematik ausschlaggebend gewesen sind. So herrscht neuerdings auch in diesem Gebiete eine derartige Mißachtung selbst der sichersten morphologischen Merkmale, die bei der großen Verbreitung der Vertreter der Gattung *Trypanosoma* zwar verständlich wird, aber im Bau der Trypanosomen durchaus nicht begründet ist. Bei genauerem Zusehen finden sich doch einige zuverlässige Unterscheidungs- und Einteilungsmerkmale, die trotz der großen Formveränderlichkeit der Trypanosomen ständig nachzuweisen sind, und daß ein natürliches System sich nur auf die Morphologie und Entwicklung aufbauen darf und den Wirt nur im

äußersten Notfalle zur Kennzeichnung mit heranziehen darf, das braucht hier gar nicht weiter begründet zu werden. Die Merkmale, die sich mit Erfolg zur Einteilung der Trypanosomen heranziehen lassen, sind die folgenden: Gestalt des Blepharoplastes (rund oder stäbchenförmig quergestellt), freies Geißelende, Gestalt des Hinterendes bei der Blutform, Verhalten bei der Teilung.

Diese Merkmale sind zum Teil auch für die Schwärmform der Kultur so charakteristisch ausgeprägt, daß der erste Blick auf ein Präparat einer degenerationsfreien Plattenkultur hinreicht, die Art mit Sicherheit festzustellen.

Erste Gruppe.

Blepharoplast stäbchenförmig quergestellt. Hinterende der Blutform zugespitzt; normale Blutform mit spitzem Hinterende.

Die Fischtrypanosomen. Große, schlangenförmig gewundene Tiere mit schnabelartig zugespitztem Hinterende. Undulierende Membran läuft in mehreren Windungen um den Körper herum und endet in einer freien Geißel.

Bei der großen Artenzahl der Fischtrypanosomen dürfte das Kulturverfahren zur Klärung der Artengrenzen noch recht wertvolle Dienste leisten können. Bis jetzt liegen zwar eine Reihe von Arbeiten über ihre Züchtung vor. Eine genaue cytologische Durcharbeitung der Kulturen fehlt aber noch. Die Fischtrypanosomen sind sehr leicht züchtbar und beginnen ihre Vermehrung teilweise schon im unverdünnten Blute. Hypotonische Nährböden scheinen für ihr Wachstum besonders günstig zu sein, ja *Robertson* 1911 sieht nach ihren Versuchen am Goldfischtrypanosoma in der Tonussenkung die Ursache und den Anreiz zur Vermehrung. Die Züchtung geschieht am besten auf dem hypotonischen Blutagar nach *Ponselle* 1913. *Nieschulz* (unveröffentlicht) züchtete mehrere Trypanosomen von Hamburger Elbfischen auf Platten hypotonischen Pferdeblutagars.

Die Amphibientrypanosomen. Ebenfalls schlangenförmig gestaltete Blutformen mit quergestelltem stäbchenförmigen Blepharoplaste, spitzem Hinterende und freiem Geißelende bei frischer Infektion. Bei alter Infektion kommt es bei den Froschtrypanosomen zur Ausbildung von gerippten oder blattartig flachen Riesenformen, bei denen infolge des Riesenwachstums oder der Verbreiterung das zugespitzte Hinterende und das freie Geißelende verschwinden können.

Tryp. tritonis *Ogawa* 1913 aus dem japanischen Molche *Triton pyrrhogaster* wurde von seinem Entdecker in Blutbouillon nach *Myajima* gezüchtet.

Tryp. rotatorium *Mayer* 1843, das gemeine Froschtrypanosoma ist sehr leicht züchtbar. Es wurde gezüchtet von *Lewis* und

Williams 1905 im Kondenswasser von Agar, dem etwas infiziertes Blut zugefügt wurde; im Kondenswasser von *Novy-Nealschem* Kaninchenblutagar von *Bouet* 1906, in Schafblutbouillon von *Nöller* 1913 und 1917 auf Pferdeblutagarplatten, auf denen bei unmittelbarer Aussaat des infizierten Blutes Einzelkolonien erzielt werden können. Von *Mendelejeff-Goldberg* 1913 und *Nöller* 1913 und 1917 serologisch untersucht, von *Nöller* 1913 und *Ponselle* 1917 und 1919 in seiner Teilungsphysiologie behandelt. Die Subkulturen sind noch nach Monaten für Kaulquappen und Frösche infektiös und können selbst bei infizierten Fröschen pathogen wirken (Superinfektion, *Nöller* 1917).

Die Reptilientrypanosomen. Merkmale wie bei den Amphibientrypanosomen. Kulturelle Untersuchung liegt noch ganz im Argen. Die Züchtung hat eine gewisse Bedeutung erlangt bei dem *Trypanosoma platydaetyli Catouillard* 1906 aus dem Blute des Geckos *Platydaetylus muralis*, weil dieses *Trypanosoma* bei der Züchtung der Leptomonaden des Geckoblutes gelegentlich zur Beobachtung kommen kann (*Sergent, Lemaire* und *Senevet* 1914).

Säugetiertrypanosomen der ersten Gruppe (Blepharoplast stäbchenförmig, quergestellt, Hinterende der Blutform spitz).

Das gemeine Rindertrypanosoma (*Tryp. theileri Laveran* 1902). Besitzt im Blute wie in der Kultur ein langes freies Geißelende. Kulturform durch das lange freie Geißelende und durch deutliche, knöpfchenartige Verdickung des Geißelendes ausgezeichnet und durch diesen Geißelendknopf leicht kenntlich. Im Blute vielgestaltig und besonders bei alter Infektion zur Ausbildung von Riesenformen neigend.

Das Rindertrypanosoma gehört zu den am leichtesten züchtbaren Trypanosomen und verdankt den Nachweis seiner weiten Verbreitung dieser leichten Züchtbarkeit. *Myajima* 1907 erhielt seine Kultur beim Einbringen von defibriertem Blute in Nährbouillon gelegentlich von Versuchen, ein Rinderpiroplasma zu züchten. *Martini* 1909 die Trypanosomennatur der Kulturformen klar. *Crawley* gelang ebenfalls in Blutbouillon nach *Myajima* der kulturelle Nachweis des Rindertrypanosomas in Amerika im Jahre 1909. Nachdem *Knuth* mit seinen Schülern unter Anwendung des gleichen Kulturverfahrens die weite Verbreitung und große Häufigkeit der Trypanosomen in Deutschland 1910 festgestellt hatte, sind in vielen Gegenden die gleichen Erfahrungen gemacht worden. Die Kultur im Kondenswasser von Blutagar beschreibt *K. Behn* 1911. Die Züchtung aus dem Darms einer Bremse und damit der Nachweis für deren Überträgerrolle gelang *Nöller* 1916. Im nächsten Jahre wurde die schon kurz angegebene Züchtung auf Platten ausführlich behandelt und die charakteristische Wuchsform abgebildet (vgl. Tafel III, Fig. 6), die inzwischen auch an einem Stamme aus dem Rinderblute bestätigt werden konnte. *Trautmann* gelang 1920 nach *Nöllers* gleichen Befunden am Kreuzschnabeltrypanosoma die experi-

mentelle Überführung der Kulturformen in die Trypanosomenform durch Halten der Platten bei 37°.

In den Blutbouillonröhrchen erscheinen die ersten Flagellaten auf der Oberfläche der Blutkörperchensäule nach 2—4 Tagen. Wegen des üppigen Wachstums müssen die Kulturen bei Zimmertemperatur alle 5—15 Tage umgeimpft werden. Bei 37° tritt ein Überhandnehmen der Degenerationsformen noch schneller ein, so daß manchmal 6—7tägige Platten schon nahezu keine lebenden Trypanosomen mehr enthalten. Bei der Leichtigkeit der Züchtung ist es nicht sehr verwunderlich, daß *Johns* 1914 den Übergang der Bluttrypanosomen in die Kulturform sogar durch Zusatz des halben Volumens einer 1%igen Traubenzuckerlösung zu dem defibrinierten Rinderblute beobachten konnte. Das serologische Verhalten der Kulturformen prüfte *Trautmann* 1921.

Das Rattentrypanosoma (*Tryp. lewisi* *Kent* 1881). Das viel studierte Rattentrypanosoma, im Blute ausgezeichnet durch sein scharf zugespitztes Hinterende, schmale Gestalt und 8—10 μ langes, freies Geißelende, ist das erste in echter Kultur gewonnene Trypanosoma. *Mac Neal* und *Novy* haben 1903 den Parasiten im Kondenswasser des nach ihnen genannten Kaninchenblutagars gezüchtet. Das Wachstum erfolgt schon, wenn der Nährboden nur zum fünften Teile aus Blut besteht, besser jedoch bei einem Verhältnis von einem oder zwei Teilen Blut auf einen Teil Agar. Bei Zimmertemperatur geht das Wachstum langsam von statten, bei 37° erreichen die Röhrchen den Höhepunkt ihrer Entwicklung in 8—12 Tagen und sterben in 15 bis 20 Tagen aus. Bei Zimmertemperatur konnten *Mac Neal* und *Novy* 1903 in einem Blutagarröhrchen mit Zusatz von Glykokoll und asparaginsaurem Natrium eine Kultur 306 Tage am Leben erhalten. Die Kulturen sind sowohl bei Aufbewahrung in Zimmertemperatur wie im Brutschranke noch lange Zeit infektiös. *Novy* 1907 konnte noch mit zwei Jahre lang fortgezüchteten Kulturen eine Infektion erzielen. Trotz der zahlreichen Kulturarbeiten steht ein einwandfreies cytologisches Studium der Kulturformen noch aus. In der ersten Zeit treten nach den einzelnen Forschern leptomonas-, crithidia- oder sogar leishmaniaförmige Flagellaten auf. In älteren Röhrchen sind von *Delanoe* 1911 auch Trypanosomenformen gefunden worden. Die Plattenkultur ist noch nicht versucht worden, dürfte aber wohl ohne Schwierigkeiten gelingen. Die Immunisierung mit Kulturen ist von *Novy*, *Perkins* und *Chambers* 1912 erreicht worden. Auch bei den Versuchen von *Roudsky* 1910, 1911 über die Infektion von Mäusen mit Rattentrypanosomen sind teilweise Kulturen zur Verwendung gelangt.

Schizotrypanum cruzi *Chagas* 1909. Das Schizotrypanum cruzi weicht von den Trypanosomen der Ratten durch seine ganz ausgiebige Vermehrung im geißellosen Zustande unter dem Bilde der Leishmania-Formen ab.

Seine Züchtung gelang *Chagas* 1909 im Kondenswasser des Kaninchenblutagars nach *Mac Neal* und *Novy*. Die Kulturformen wurden schon recht gut beschrieben. In der ersten Zeit kommt es in dem Kondenswasser zur Vermehrung nur unter dem Bilde geißelloser Leishmaniaformen; später treten große Crithidien auf. Bezüglich der Virulenz der Kulturen bemerkt *Chagas*, daß sie manchmal bei den Versuchstieren eine Infektion erzeugen, manchmal nicht. *M. und P. Delanoe* haben 1912 die Züchtung in gleicher Weise vorgenommen und geben an, die Kulturen seien nicht infektiös. *Mayer* und *Rocha-Lima* 1914 konnten keine rechten Kulturen erzielen. *Bayma* 1914 gelang die Züchtung auf Meerschweinchenblutagar, nicht dagegen auf Affenblutagar und merkwürdigerweise auch nicht auf Kaninchenblutagar im Gegensatz zu *Chagas* 1909. *Nöller* 1917 züchtete den Parasiten im Kondenswasser von Traubenzuckerpferdeblutagar und von diesen Kulturen ausgehend auf seinen Traubenzucker-Pferdeblut-Agarplatten. Wegen des langsamen Wachstums müssen die Platten bei 30° gehalten werden, sonst trocknen sie bis zum Aufgehen der Kolonien soweit aus, daß das Wachstum ganz unterbleibt. Bei 30° gelang inzwischen auch das Herauszüchten aus dem Muskel einer infizierten Maus durch einfaches Ausstreichen auf die Platte. Die Kolonien brauchen bei 30° etwa 15—20 Tage, ehe sie bequem abzustechen sind. Einmal üppig wachsende Plattenkulturen können bei Aufsaat genügender Mengen der Ausgangskultur auch bei Zimmertemperatur gehalten werden. Dann wird das Umzüchten erst etwa nach Monatsfrist oder nach einer noch längeren Zeit nötig. Die so fortgezüchteten Plattenkulturen sind noch nach 48 Monaten infektiös und virulent.

Das Schaftrypanosoma (*Tryp. melophagium Flu* 1908). Das Schaftrypanosoma war im Schafblute wegen seines sehr spärlichen Vorkommens im Blute nur wenige Male gesehen worden. Im Überträger dagegen, in der gemeinen Schaflausfliege, *Melophagus ovinus*, einer den Glossinen sehr nahestehenden pupiparen Fliege, wimmelt der Darm fast regelmäßig von den Entwicklungsformen des Trypanosomas. Diese Flagellaten sind viel früher entdeckt worden als ihre Form im Schafblute und sie hatten wegen ihrer Crithidienform den Namen *Crithidia melophagia* erhalten. Wegen des großen Mißverhältnisses in der Häufigkeit bei den Schaflausfliegen einerseits und bei den Schafen anderseits war der Zusammenhang beider Parasiten angezweifelt worden. Durch *Nöller* 1917 wurde die Entwicklungsform aus der Schaflausfliege im Kondenswasser von Traubenzucker-Pferdeblut-Agar gezüchtet und auf Traubenzucker-Pferdeblut-Agarplatten von dem begleitenden *Coccobacillus Rickettsia melophagi* getrennt, nachdem schon *Wenyon* in einer Notiz über die gelungene Züchtung auf NNN-Agar berichtet hatte. Die Plattenkulturen gelangen *Nöller* nur bei einer Temperatur von mindestens 28—30°. Bei Zimmertemperatur erfolgte kein Wachstum. In den Röhrchen ist allenfalls noch

bei 22° nach Monatsfrist oder noch später ein geringes Wachstum nachzuweisen. Nach Ermittlung dieser großen Empfindlichkeit gegen niedere Temperaturen nahm *Nöller* die Züchtung des Trypanosomas aus dem Schafblute 1919 in Angriff und konnte bei 30° sowohl in Schafblutbouillon (defibriniertes Schafblut und Nährbouillon aa) wie im Kondenswasser von Traubenzucker-Pferdeblut-Agarröhrchen die Schaftrypanosomen züchten. Durch die bequeme Blutbouillonzüchtung konnte in mit Schaflausfliegen behafteten Schafherden die weite Verbreitung des Schaftrypanosomas bei Schafen und selbst bei Winterlämmern nachgewiesen werden. Durch genauen Vergleich der Kulturformen aus der Schaflausfliege und aus dem Schafblute konnte die Gleichheit der Kulturformen an den gleichen Maßen und an dem kurzen freien Geißelende, das die lang hinaufziehende undulierende Membran nur wenig überragt, unschwer erwiesen werden. Ebenso leicht war die Trennung von dem Rindertrypanosoma, dessen Kulturformen sich durch ihre lange, freie Geißel und durch ihr viel üppigeres Wachstum, das ganz im Gegensatze auch bei Zimmertemperatur üppig einsetzt, scharf unterscheiden lassen. Das Schaftrypanosoma ist also in den Kulturen durch seine hohen Ansprüche an die Temperatur charakterisiert. Bei Zimmertemperatur und bei 20° bleiben die Blutbouillonröhrchen mit infiziertem Schafblute vollkommen steril. Bei der Plattenkultur vollends empfiehlt sich eine Temperatur von mindestens 30° oder gar 37°. Als Blut zu den Platten scheint das Schafblut dem Pferdeblute überlegen zu sein. Besonders schöne Kulturen lassen sich erzielen, wenn man etwa 0.5 cm³ von der Oberfläche der Blutkörperchensäule eines gut bewachsenen Schafblutbouillonröhrchens auf eine Traubenzucker-Schafblut-Agarplatte aussät und die Platte bei 37° hält. Nach 5—6 Tagen sind die Kolonien in Form eines flachen, an den Rändern verschwimmenden Rasens sichtbar. Die Kulturformen zeigen auf diesen Platten auch häufig Trypanosomenform.

Das Schaftrypanosoma ist durch seine Kultur in seiner weiten Verbreitung und in seiner Identität mit den Entwicklungsformen aus dem Überträger als mit diesen zusammengehörig erwiesen worden. Nachdem dieser Beweis so erbracht worden war, hat *Kleine* 1919 eine Bestätigung auch durch Versuche mit Schafläusen auf anderem Wege, allerdings unter Hintansetzung eines morphologischen Studiums gegeben und den Beweis durch die Kultur nur als wahrscheinlichen angesehen. Dazu muß mit aller Bestimmtheit bemerkt werden, daß die Morphologie bei der wissenschaftlichen Arzenteilung die erste Rolle als Entscheidungsmerkmal zu spielen hat und daß experimentelle und entwicklungsgeschichtliche Merkmale erst in zweiter Linie herangezogen werden dürfen.

Die Züchtung der Schaftrypanosomen gelingt übrigens nicht immer so leicht wie bei dem in bezug auf Temperatur und Nährflüssigkeit weniger anspruchsvollen Rindertrypanosoma. So konnte z. B. *Bönning* 1920 keine Kulturen bei deutschen Schafen erzielen, während *Dourves* 1920 in Holland erfolgreich Kulturen anlegte.

Zweite Gruppe.

Blepharoplast ist stets rund oder doch nicht so auffällig langgestreckt stäbchenförmig wie bei der ersten Gruppe. Hinterende der Blutform zugespitzt oder abgerundet.

Die Vogeltrypanosomen. Die Vogeltrypanosomen scheinen durchgehend der Gruppe 2 anzugehören. Der Blepharoplast ist groß und rund. Die meist recht großen, zum Riesenwachstume neigenden Blutformen, die stets ziemlich vielgestaltig sind, zeichnen sich durchgehend durch scharf zugespitztes Hinterende aus.

Die Züchtung hat gerade bei den Vogeltrypanosomen die größte Rolle gespielt, weil sie alle leicht züchtbar sind und weil ihre weite Verbreitung bei den Vögeln gerade wegen ihrer großen Seltenheit im peripheren Blute erst durch die Züchtung aufgedeckt werden konnte.

Die Züchtung der Vogeltrypanosomen ist 1905 von *Novy* und *Mac Nael* in großem Umfange an nordamerikanischen Vögeln auf dem Kaninchenblutagar der Forscher angewandt und durchgeprüft worden. Durch den genauen Vergleich der Kulturformen war es den Forschern gelungen, mehrere Arten als verschieden zu erweisen. Im gleichen Jahre hatte sich *Thiroux* mit der Züchtung der Reisvogeltrypanosomen (*Tryp. paddae* *Laveran* und *Mesnil* 1904) beschäftigt und als Nährboden Gänseblutagar empfohlen. Bei Einspritzung reich bewachsener Kulturen in Vögel der betreffenden Art erzielten nur *Novy* und *Mac Neal* 1905, *Thiroux* 1905 und *França* 1912 vereinzelte positive Ergebnisse. Was die Nährböden anlangt, so hat sich die Verwendung von Vogelblut als Zusatz zu dem Agar als überflüssig herausgestellt; die Vogeltrypanosomen wachsen auf den meisten anderen Blutarten ebenso gut und besonders bei Verwendung erhitzter Nährböden nach dem Vorschlage von *Mathis* 1906 scheint die Blutart, die zum Agar zugesetzt wird, ziemlich gleichgültig zu sein.

Durch *Nöller* 1917 ist ein Vogeltrypanosoma auf seinen Pferdeblutagarplatten gezüchtet worden. Dieses Trypanosoma (*Tryp. syrnii* [*Mayer* 1911]) zeichnete sich durch makroskopisch leicht unterscheidbare Wuchsform mit plumpen Ausläufern bei Strichimpfung aus. Ein aus dem Kreuzschnabel gezüchtetes Trypanosoma (*Tryp. loxiae*, *Nöller* 1920) konnte der Entdecker bei Haltung im 37°-Brustschranke auf den Platten experimentell in die Blutform überführen und bei Verimpfung in dieser Form in allen Versuchen regelmäßig erfolgreich auf neue Kreuzschnäbel sowie auf Zeisige und Kanarienvögel übertragen. Die Übertragung auf Zeisige und Kanarien gelang auch manchmal mit Zimmertemperaturplatten mit *Crithidia*-Formen (vgl. Tafel II, Fig. 1—5).

Eine genaue morphologische Untersuchung der Kulturformen seines *Tryp. fringillinarum* aus dem Buchfinken und aus dem Bergleinfinken gibt *Woodcock* 1910. Zum Nachweise der Trypanosomen bei Vögeln ohne mikroskopischen Blutbefund haben außer den schon an-

geführten Forschern das Kulturverfahren herangezogen: *Edm. und Ét. Sergent* 1907 in Algier, *Bettencourt* und *França* 1907 in Portugal, *de Cerqueira* 1906 in Brasilien, *v. Schuckmann* und *Wernicke* 1912, 1913 in Deutschland. Zur Klärung des Zusammenhanges, der zwischen den Vogeltrypanosomen und den intracellulären Blutparasiten des Vogelblutes bestehen sollte, wandten das Züchtungsverfahren an: *Novy* und *Mac Neal* 1905, *Mayer* 1911 und *v. Wasielewski* und *Wülker* 1918. Zu rein cytologischen Untersuchungen benutzte Vogeltrypanosomenkulturen *Rosenbusch* 1909.

Die Möglichkeit der Trennung verschiedener Vogeltrypanosomen auf kulturellem Wege mit Hilfe ihrer Wuchsform zeigte *Nöller* 1920: Das Waldkauztrypanosoma zeigt bei Strichimpfung lange plumpe, an ihrer Basis nicht verschwimmende Ausläufer, das Kreuzschnabeltrypanosoma zeigt verschwimmende Ausläufer, das Trypanosoma des Hühnerhabichts wächst ausläuferfrei. (Vgl. Tafel II, Fig. 1—5!)

Die pathogenen afrikanischen Säugetiertrypanosomen und ihren nächsten Verwandten. Blepharoplast rund, klein. Hinterende der Blutform abgerundet. Vermehrung vorwiegend im Blute unter dem Bilde der Zweiteilung im geißeltragenden Zustande.

Das *Naganatrypanosoma* (*Tryp. brucei* *Plimmer* und *Bradford* 1899). Die Züchtung der pathogenen afrikanischen Trypanosomen ist sehr schwierig, und das *Naganatrypanosoma* ist das einzige, bei dem das Problem gründlich gelöst ist. *Novy* und *Mc Neal* erhielten 1903, 1904 die ersten Kulturen im Kondenswasser von Kaninchenblutagar, der aber mindestens die gleiche Menge Blut auf einen Teil Agar enthalten mußte. *Smedeley* hat die Versuche 1905 in gleicher Weise wiederholt, ebenso *Buchanan* 1911. Mit Traubenzuckerzusatz zu Pferdeblutagar und Rinderblutagar hatte *Hagemeister* 1914 einige Ergebnisse, konnte aber keine Passagen erzielen. *Behrens* 1914 gibt eine ausführliche Beschreibung der Faktoren, die für das Wachstum des *Tryp. brucei* wichtig sind und beschreibt Immunisierungsversuche mit abgeschwächten Kulturen. Seine Arbeit ist als die derzeit erfolgreichste auf diesem Gebiete zu betrachten.

Nötig ist bei der Züchtung in erster Linie, daß der Nährboden mindestens einen Teil Blut, besser zwei auf einen Teil Agar enthält. Die Umwandlung der Blutformen in die Kulturform geschieht sehr langsam und nimmt bei Zimmertemperatur unter Umständen gegen 20 Tage in Anspruch. Während dieser Zeit geht die große Mehrzahl der eingesäten Trypanosomen zugrunde und nur wenigen gelingt die Umwandlung. Es muß stets eine große Reihe von Röhren angesetzt werden, wenn die Kultur aus dem Blute gelingen soll. Einmal gewonnene Stämme sind leichter fortzuzüchten. Die günstigste Temperatur liegt bei 25 bis 34°. *Behrens* konnte die Züchtung erfolgreich auch im Kondenswasser von Serumagar durchführen. In reinem Serum oder in Serum mit

Bouillon hatte *Ungermann* 1918 unter anaeroben Bedingungen keine brauchbaren Ergebnisse. Verfasser gelang dagegen die Überführung in die Kulturform unschwer bei Einsaat in *Myajimasche* inaktivierte Pferdeblutbouillon bei 30°. Die Kulturen blieben über einen Monat am Leben. Leider konnten die Versuche aus äußeren Gründen nicht fortgesetzt werden.

Die Virulenz der Kulturen ist in einzelnen Fällen noch nach zahlreichen Generationen nachzuweisen.

Tryp. rhodesiense *Stephens* und *Fantham* 1911. Über gelungene Züchtung berichten 1912 *Thomson* und *Bayon*. *Thomson* benutzte den gewöhnlichen *Novy-Mac-Neal*-Kaninchenblutagar, *Bayon* einerseits eine Mischung von Amöbenagar nach *Musgrave* und *Clegg* und andererseits von mit Wasser und Traubenzucker hergestelltem Agar mit Kaninchenblut. Die Züchtung macht große Schwierigkeiten.

Tryp. dimorphon *Laveran* und *Mesnil* 1904. Die Züchtung gelang in der gebräuchlichen Weise nach *Bruce* und seinen Mitarbeitern 1909 und nach *Laveran* 1909.

Tryp. vivax *Ziemann* 1905. Die Kultur ist *Bruce* und seinen Mitarbeitern 1910 im Kondenswasser des *Novy-Mac Nealschen* Blutagar gelungen. *Mayer* 1912 hält es nicht für ausgeschlossen, daß die aus dem Ziegenblute stammende Kultur die Form eines anderen Trypanosomas darstellt.

Tryp. equiperdum *Doflein* 1901. Das Beschälseuchetrypanosoma macht der Züchtung ganz besondere Schwierigkeiten. Nur *Mohler* 1911 sind echte Kulturen mit Übergang der Blutformen in die Kulturformen in der gebräuchlichen Weise bei Aufwand großer Nährbodenmengen gelungen.

Tryp. gambiense *Dutton* 1902. Die Kultur wurde zuerst von *Gray* und *Tulloch* 1906 versucht und von *Thomson* und *Sinton* 1912 in ihrer Morphologie und in ihren Beziehungen zu den Entwicklungsformen in der Glossine studiert. Die Technik bietet nichts Abweichendes. Die Züchtung gelingt nur schwer.

Tryp. evansi *Steel* 1885. Der Surraerreger, konnte trotz mehrerer Versuche bisher nicht gezüchtet werden.

c) Die Züchtung der Coccidien und Hämosporidien.

Die Züchtung der Coccidien und Hämosporidien kann sich lediglich auf die agame Vermehrung beschränken, d. h. auf die Fortpflanzung durch Schizogonie. Die Darmcoccidien scheiden bisher aus, weil bei ihnen vor allem wohl wegen der Schwierigkeit der Darbietung eines reinen Nährsubstrates Versuche nicht vorliegen, denn es handelt sich hier ja fast durchgehend um intracelluläre Parasiten, deren Wirtszellen einen mit Bakterien erfüllten Darm begrenzen.

Tafelerklärung.

Die Figuren 1–7 enthalten typische Wuchsformen von Blutflagellaten bei Strichimpfung mit je einer Öse Flagellatenmaterial auf Traubenzucker-Pferdeblutagar-Platten von 9–10 cm Durchmesser bei Zimmertemperatur.

Fig. 1.

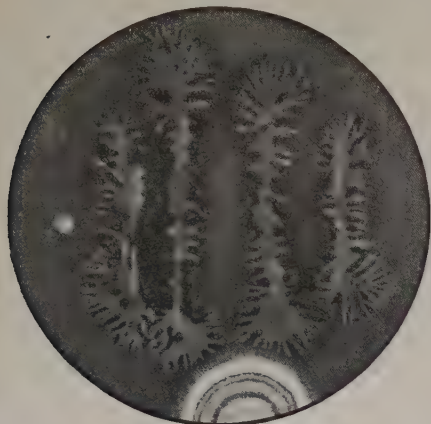


Fig. 2.



Kreuzschnabeltrypanosoma (*Tryp. loxiae*),
siebentägige Platte.
(Eine Schimmelkolonie und ein Luftkeim vorhanden.)

Tryp. loxiae, 9tägige Platte. Ausläufer plump,
verschwindend.

Fig. 3.



Tryp. syrnii (Mayer), siebentägige Platte.

Fig. 4.

Fig. 5.



Tryp. syrnii (Mayer), 15tägige Platte.



Tryp. syrnii (Mayer), 29tägige Platte.

Fig. 1–5. Vogeltrypanosomen.

Bei den Blutcoccidien, den Hämogregarinen liegt lediglich eine Notiz vor, die einen Fingerzeig in dieser Richtung geben kann. *França* hat 1918 mit den Hämogregarinen der Eidechse gearbeitet. Sie kommen im Blute als würmchenförmige Organismen vor, die als Gameten oder Schizogonievorstufen aufzufassen sind und sich normalerweise in den Kapillaren der Leber, Milz u. s. w. als beschaltete Schizonten (Cysten) vermehren. Diese Schizonten konnte *França* schon nach drei Stunden erzielen, wenn er das Herz abband und in physiologische Kochsalzlösung legte und noch besser in riesiger Zahl, wenn er die Leber nach Abbinden der Gefäße drei und mehr Tage in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrte. Er sieht den Hauptanreiz zur Teilung in der Bewegungslosigkeit des ungeronnenen Blutes, Faktoren, die vielleicht natürlicherweise das Vorkommen der Schizogonie in den Kapillaren der parenchymatösen inneren Organe erklären, die geringe Stromgeschwindigkeit haben. Der geringeren Oxydation mißt er keine Bedeutung zu. An den Zuckergehalt des Leberblutes scheint *França* nicht gedacht zu haben. Wenn auch mit dieser Notiz die Kenntnisse über die Züchtung in vitro bei den Blutcoccidien erschöpft sind, so sei doch darauf hingewiesen, daß viele Hämogregarinen gerade deshalb so gute Versuchsobjekte darstellen, weil ihre Vermehrungsformen, die leicht kenntlichen Cysten, häufig im peripheren Blute nicht vorkommen und weil deshalb einwandfreies Ausgangsmaterial ohne Vermehrungsformen leicht zu beschaffen ist.

Nicht so günstig liegen in dieser Beziehung die Verhältnisse bei den Hämosporidien, bei denen Züchtungsversuche bei *Plasmodium Haemoproteus* und *Babesia* vorliegen. Die Wichtigkeit dieser Formen für Pathologie und Protozoologie zusammen mit der Möglichkeit, leicht Ausgangsmaterial und rote Blutkörperchen als Wirtszellen zu beschaffen, haben hier zahlreiche Versuche und Arbeiten gezeitigt, ohne daß jedoch das Problem der Züchtung trotz der Arbeiten von *Bass* 1911, 1912, *Bass* und *Johns* 1912, *Ziemann* 1913, 1914 und andere Forscher bei den Malariaparasiten und von *Knuth* und *Richters* 1913, *Thomson* und *Fantham* 1913 und *Carpano* 1914 bei den Piroplasmen als gelöst betrachtet werden kann. Daß sich Malariaparasiten selbst im Präparate auf geheiztem Objektträger noch etwas weiter entwickelten, war ja bekannt (*Schaudinn* 1901).

Bass hat 1912 durch Traubenzuckerzusatz, Entfernung der Leukozyten und streng anaerobe Haltung der Röhren bei den verschiedenen Malariaparasiten mehrere Generationen erzielt, d. h. also die Schizogonie sich mehrmals wiederholen sehen und beträchtliche Vermehrung der Parasiten erzielt. *Perekropoff* 1914 will in seinen Kulturen des Tropicaparasiten sogar Anzeichen von Sporogonie gefunden haben, eine Angabe, deren Nachprüfung wegen ihrer Tragweite sehr wichtig ist. Denn wenn sich auch die Ookinetenbildung in vitro leicht erzeugen läßt, so war Weiterentwicklung nicht beachtet worden. Und gerade das Auftreten

von Vermehrungsvorgängen an dem Ookineten, also der Zygote, oder am Makrogameten in vitro könnte Licht auf die Stellung der meist teilungsunfähigen Gameten zu den ungeschlechtlichen Vermehrungsformen bringen und so durch Aufklärung der Teilungsphysiologie der einzelnen Formen wertvolle Aufschlüsse über das Wesen des Rezidives bringen, das ja bei der Malaria eine so große Rolle spielt. Gerade in dieser Hinsicht wertvoll als Versuchsobjekt sind die *Hämoproteus*-Parasiten der Vögel, weil bei ihnen genau wie bei den Hämogregarinen zeitweise nur teilungsunfähige und bei Verimpfung auf neue Tiere deshalb meist nicht infektiöse Formen im Blute kreisen. Leider liegt nur eine Veröffentlichung von *Acton* und *Knowles* 1914 über Züchtungsversuche bei *Haemoproteus columbae* vor. Die Piroplasmen (Babesien) sind ebenso wie die Plasmodien von *Knuth* und *Richters* 1913, *Ziemann* 1914 und *Thomson* und *Fantham* 1913 nach den *Baßschen* Vorschriften in vitro bei Körpertemperatur zur Vermehrung gebracht worden. Zu vermissen bleibt aber, daß sie bisher ebensowenig wie die Plasmodien bei Einsaat in Röhrchen mit gesundem, parasitenfreiem Blute in genügend langen Reihenfolgen von Generationen gezogen werden konnten, so daß die Dauer der Vermehrung bisher in den sog. Kulturen kaum größer war als die längste Lebenderhaltung in vitro im unverdünnten Blute bei kühler Temperatur. Daß bei den Gewebs- und Zellparasiten unter den Sporozoen vielleicht die Gewebeskultur in vitro nach *Carrell* noch positive echte Kulturen ergeben kann, sei hier nur angedeutet.

d) Die Züchtung der parasitischen Infusorien.

So alt und so weit verbreitet die Kenntnisse von der Züchtung der in faulendem Wasser lebenden Infusorien ist, so kläglich sind bis jetzt die Ergebnisse aller Versuche der Züchtung der parasitischen Infusorien. Die vorliegenden Angaben können lediglich als Vorversuche aufgefaßt werden. Von einer befriedigenden Lösung der Aufgabe sind wir noch weit entfernt.

Bei den freilebenden, in faulenden Wässern vorkommenden Bakterienfressern ist ja die Züchtungstechnik bereits soweit ausgebildet worden, daß eine Sterilzüchtung ohne lebende Bakterien durch allmähliches Verdrängen und durch Darbieten abgetöteter Bacillen erreicht worden ist. Die Technik dieses Vorgehens muß allen denen geläufig sein, die sich mit der Züchtung der parasitischen Formen befassen wollen und die Arbeiten von *Öhler* 1919 und 1920 über Flagellaten- und Ciliatenzucht auf reinem Boden müssen dazu eingesehen werden.

Die älteren Versuche der Züchtung parasitischer Infusorien stammen von *Dobell* 1909, *Walker* 1908, 1909, *Aragao* 1912 und *Pro-wazek* 1913, 1914. *Walker* 1908, 1909 erhielt bei *Balantidium*- und *Nyctotherus*-arten Anzeichen einer Vermehrung auf einem Nährboden aus zwei Teilen Agar, 100 Teilen destilliertem Wasser und

einem Teile Normalnatronlauge. *Dobell* 1909 beobachtete langes Überleben und eine gewisse Vermehrung bei dem *Nyctotherus cordiformis* und *Balantidium entozoon* aus Fröschen bei Haltung in Kotinfusionen. *Comes* 1909 beschrieb Blutaufnahme bei letzterer Art und *Aragao* 1912 züchtete den *Nyctotherus cordiformis* aus dem Darne des südamerikanischen Frosches *Leptodactylus ocellatus* in physiologischer Kochsalzlösung mit 0·5% Hühner-eiweiß in Petrischalen. Die Fütterung geschah mit zugesetzten Blutkörperchen. *Prowazek* 1913, 1914 konnte mit Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung zu den stark verdünnten alkalischen Faeces in Deckglaskultur eine Vermehrung des *Balantidium coli* beobachten.

In neuerer Zeit will *Sangiorgi* 1918 *Balantidium minutum* und *Nyctotherus faba* aus menschlichen Faeces gezüchtet haben, ebenso *Senéz* 1918 ein *Balantidium*. *Hinkelmann* 1919 gibt an, das *Balantidium coli* sei leicht züchtbar in destilliertem Wasser mit Zusatz von $\frac{1}{2}$ % Serum oder Blut. Im Brutschranke soll in 48 Stunden deutliche Vermehrung und Sphärenbildung im Ektoplasma eintreten (Degeneration?). Die Angaben bedürfen noch der Nachprüfung.

3. Die wichtigsten Nährböden für die parasitischen Protozoen.

a) Die Nährböden für die Amöbenzüchtung.

Amöbenagar nach *Frosch* 1897: Agar 0·5 bis 1·0, Nährbouillon 10·0, Leitungswasser 90·0.

Das Gemisch wird bis zur Auflösung des Agars im Dampftopfe oder im Wasserbade gekocht, am besten sogleich in der gebräuchlichen Menge in Röhrchen abgefüllt (für Schrägagarröhrchen je nach der Röhrchendicke 6—8 cm³, für Platten die doppelte Menge) und nach Verschuß der Röhrchen mit Zellstoff- oder Wattepfropfen zweimal im Dampfe etwa eine halbe Stunde sterilisiert. Die fertigen Röhrchen werden im Eisschranke am besten noch in einem luftdicht verschlossenen Gefäße zur Vermeidung der Eintrocknung aufbewahrt und bei Bedarf zur Herstellung der Schrägröhrchen oder zum Plattengießen verflüssigt.

Amöbenagar nach *Musgrave* und *Clegg* 1904: Agar 20·0 g, Nährbouillon 0·3 bis 0·5 cm³, Wasser 1000·0 cm³.

Dem gelösten Agar wird mit 1·5% seines Volumens Normalnatronlauge zugesetzt. Dann wird er abgefüllt und sterilisiert.

Amöbenährböden nach *Cutler* 1918 (für die Dysenterieamöbe!). 1. Eiernährböden nach *Dean* und *Mouat* 1916: Der Inhalt eines Eies (mit Eigelb) wird in einer Glasflasche mit Glasperlen geschüttelt, bis eine vollkommene, gleichmäßige Emulsion entsteht. Dann werden 300 cm³ destilliertes Wasser zugesetzt und es wird weiter geschüttelt.

Die Schüttelflaschen werden in ein Wasserbad eingebracht und langsam unter ständigem kräftigen Schütteln bis zum Kochen erwärmt und 30 Minuten bei dieser Temperatur fortgeschüttelt. Die fertige Mischung wird zu je 5 cm³ in Röhrchen gefüllt und im Autoklaven sterilisiert. Vor der Einsaat setzt man jedem Röhrchen einige Tropfen frisches Blut zu.

Blutbouillon nach Cutler 1918: 500 cm³ geronnenes Menschenblut werden in 1 l Wasser eine Stunde aufgekocht. Nach dem Filtrieren werden 0·5 % Kochsalz und 1 % Pepton zugesetzt. Es erfolgt das Abfüllen in Röhrchen und das Sterilisieren je 20 Minuten bei 100° an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Beim Gebrauch werden ebenfalls jedem Röhrchen einige Tropfen frisches Blut zugesetzt.

Die Beimpfung der Röhrchen geschieht am besten mit amöbenreichen Schleimflocken aus frischem Stuhle, u. zw. mit etwa 5—6 großen Ösen auf ein Röhrchen mit 5 cm³ Nährflüssigkeit. Die Kulturen werden 24 Stunden im Brutschranke bei 28—30° gehalten und in Zeiträumen von 24 Stunden bis drei Tagen abgeimpft, besonders früh dann, wenn der Nährboden durch starkes Bakterienwachstum sauer wird.

b) Die Nährböden für die Blutflagellaten.

1. Nährböden für die Leishmanien.

Blutagar nach Novy-Neal-Nicolle (NNN-Agar). Rezept nach Nicolle 1908: Agar 14·0 g, Kochsalz 6·0 g, Destilliertes Wasser 900·0 cm³. Herstellung des Agars, Abfüllen und Aufbewahren wie beim Amöbenagar. In die einzelnen Röhrchen muß jedoch etwas weniger Agar eingefüllt werden, weil ja noch 20—25 % Blut zugesetzt werden. Der Agar wird wie bei der Herstellung der meisten Bakterienagararten am besten einen Tag in kaltem Wasser gequellt und das Wasser wird vorteilhaft einmal gewechselt (Manceaux 1911), um wasserlösliche Verunreinigungen zu entfernen. Die von dem Agar dabei aufgenommene Wassermenge, die der Gewichtszunahme des Agars entspricht, muß natürlich bei der Bemessung des Lösungswassers berücksichtigt werden.

Zur Fertigstellung der Nährböden wird den verflüssigten und auf etwa 48—52° abgekühlten Röhrchen der vierte oder der fünfte Teil ihrer Agarmenge aseptisch durch Herzpunktion gewonnenes Kaninchenblut zugesetzt. Die schräg gelegten Röhrchen erstarren bei Zimmertemperatur in einigen Stunden bis zu ihrer vollen Festigkeit. Ihr Watterpfropfen wird bis zum Verschwinden in das Röhrchen hineingeschoben und ein die Verdunstung verhindernder luftdichter Abschluß wird durch Verkleben der Öffnung mit Wachs, mit einem weichen Paraffinstücke, mit Plastillin, durch einen gut passenden Gummistopfen oder durch Überziehen einer gut schließenden elastischen Gummikappe erzielt. Die so verschlossenen Röhrchen werden zur besseren Kondenswasserabschei-

dung 24 Stunden in den 37°-Brutschrank gestellt und sind dann zum Gebrauche fertig. Die Einsaat wird mit Platinöse, Spritze oder mit steriler Glaskapillare vorgenommen.

Peptonwasserkaninchenblutnährböden nach *Laveran* und *Pettit* 1910. Zur Gewinnung großer Kulturmengen: Pepton 2·0 g, Kochsalz 6·0 g, Wasser 900·0 cm³. Die sterilisierte Flüssigkeit wird mit der gleichen Menge defibrinierten Kaninchenblutes gemischt und in flacher Schicht am besten in Kölbchen mit breitem Boden verteilt, um der Luft mehr Zutritt zu gewähren.

Flüssiger Nährboden nach *Row* 1912: Ein Teil sterilen, defibrinierten Kaninchenblutes wird durch Zusatz von 8—10 Teilen sterilen destillierten Wassers hämolysiert, und auf je 100 cm³ der Mischung werden 0·8 oder 0·9 g sterilisiertes Kochsalz zugesetzt. Anwendung in Kölbchen oder Röhrchen in nicht zu hoher Schicht.

NNN-Agar nach *Mathis* 1911: Der mit dem Kaninchenblute versehene NNN-Agar wird einmal oder wiederholt kurze Zeit auf 80—100° erhitzt und in gleicher Weise weiterbehandelt wie der NNN-Agar.

Plattenagar mit Traubenzucker und Pferdeblut nach *Nöller* 1917 wird im nächsten Abschnitte beschrieben.

2. Nährböden für die Trypanosomen.

Flüssige Nährböden.

Blutbouillon nach *Myajima* 1907 und *Irikura* 1907: Zu 10 Teilen gewöhnlicher, schwach alkalischer, schwach saurer oder neutraler Nährbouillon werden 2—10 Teile defibrinierten Blutes zugesetzt. Das Blut wird entweder dem latent mit dem zu züchtenden Trypanosoma infizierten Tiere entnommen (Rinderblut, Schaffblut), oder es gelangt das Blut eines nichtinfizierten Tieres (Pferdes) zur Benutzung und die Einsaat der zu züchtenden Trypanosomen erfolgt in der gebräuchlichen Weise entweder durch einige Tropfen infizierten Blutes oder einiger Ösen trypanosomenhaltiger Kulturflüssigkeit. Die Trypanosomen wachsen auf der Oberfläche der Blutkörperchensäule. Zur Vermeidung der Leukocytose und der Schädigung der eingesäten Trypanosomen durch Antikörper inaktiviert *Nöller* 1913 die Blutbouillon unmittelbar nach ihrer Herstellung eine halbe Stunde bei 56° im Wasserbade, wenn das Blut infizierter Tiere (Rinder, Schafe) zur Herstellung der Blutbouillon für die Züchtung anderer Trypanosomen Verwendung finden soll.

Blutkörperchenfreier Blutbouillonabguß nach *Nöller* 1913: Durch vorsichtiges Abgießen oder Abpipettieren des über den abgesetzten Blutkörperchen stehenden klaren Anteils der Blutbouillon läßt sich eine zellenfreie, durchsichtige Nährlösung gewinnen, in der die leichter züchtbaren Trypanosomen gut gedeihen. Bei Zusatz derselben zu infiziertem Blute lassen sich die ersten Teilungen bequem beobachten.

Dem gleichen Zwecke dient die Flüssigkeit nach *Ponselle* 1917: NaCl 0.55 g, CaCl₂ 0.02 g, MgCl₂ 0.02 g, KH₂PO₄ 0.2 g, Traubenzucker 0.2 g, Pepton 1.0 g, Gelatine 0.5 g, dest. Wasser 100.0 cm³. Die Flüssigkeit wird sterilisiert und dem zu prüfenden Blute zugesetzt.

Nährböden mit Wachstum im Kondenswasser.

Blutagar nach *Novy-Mac Neal* (NN-Agar). Der einfachste NN-Agar wird hergestellt durch Mischung des gebräuchlichen Bakterienagars mit aseptisch entnommenem Kaninchenblute. Die weitere Behandlung der Röhrechen geschieht in der gleichen Weise, wie es beim NNN-Agar beschrieben worden ist.

Beim Rattentrypanosoma genügt ein Verhältnis von Blut zu Agar wie 1 : 5. Bei den pathogenen afrikanischen Trypanosomen dagegen muß die zu dem verflüssigten Agar zugesetzte Blutmenge mindestens gleich groß sein, am besten aber sogar noch das Doppelte oder Dreifache des Agars betragen. Damit bei diesen Mischungsverhältnissen ein noch einigermaßen fester Blutagar entsteht, empfehlen *Nocht* und *Mayer* 1906 einen Agar mit höherem Gehalte (2.5% Agar).

Das meist angewandte Rezept für den Ausgangsagar ist das von *Mac Neal* 1904: Fleischwasser, aus 125 g Rindfleisch mit destilliertem Wasser hergestellt 1000.0 cm³, Agar 20.0 g, Pepton 20.0 g, Kochsalz 5.0 g, Normal-Natriumcarbonatlösung 10.0 cm³. Die Mischung der verflüssigten Röhrechen mit dem Blute soll nach der ursprünglichen Anweisung bei 55° vorgenommen werden. Nach eigenen Erfahrungen gibt die Mischung mit dem soeben aus dem kochenden Wasser oder aus dem Dampftopfe herausgenommenen, noch 90—100° heißen Agar ganz die gleichen guten Nährböden. *Mathis* 1906 hat sogar die Benutzung von einmal oder mehrfach auf 80—100° erhitztem Blutagar empfohlen und mit den leichter züchtbaren Trypanosomen gute Ergebnisse erzielt. Das sehr praktische Verfahren läßt leider im Stiche, sobald die Nährböden über 50% Blut enthalten, weil in diesem Falle infolge des starken Eiweißgehaltes eine Gerinnung des gesamten Kondenswassers eintreten pflegt.

Blutagar mit Glykokoll und asparaginsaurem Natrium nach *Mac Neal* und *Novy* 1903: Zu zwei Teilen NN-Agar wird eine Mischung aus einem Teile defibrinierten Rattenblut und einem Teile einer Lösung von 1% Glykokoll und 1% asparaginsaurem Natrium zugesetzt. Der Nährboden hat sich besonders beim Rattentrypanosoma bewährt.

Traubenzucker-Kaninchenblut-Agar nach *Bayon* 1912: Der nur in Wasser mit Traubenzuckerzusatz gelöste Agar hat die Zusammensetzung: Agar 15.0 g, Traubenzucker 10.0 g, Wasser 1000.0 cm³. Der Zusatz des Kaninchenblutes erfolgt in der gewöhnlichen Weise. Das Rezept wurde für die Züchtung von *Trypanorhodesiense* angewandt.

Traubenzucker-Blutagar nach *Hagemeister* 1914: Der Traubenzucker-Blutagar von *Hagemeister* 1914 genügt für die anspruchsvollsten Trypanosomen; er unterscheidet sich von dem einfachen Agar nach *Bayon* durch seinen größeren Gehalt an Nährstoffen, die er der peptonhaltigen Nährbouillon verdankt, und durch die Benutzung von defibriertem Aderlaßblut großer Haustiere (am besten von Pferdeblut, weil dieses im Gegensatze zu dem Rinderblute und dem Schafblute bei uns nach heutiger Kenntnis keine latenten Trypanosomen enthält, die in den Kulturen Fehlerquellen abgeben können, eine Gefahr, der man bei den trypanosomenhaltigen Blutarten allerdings durch Mischung mit dem Agar in recht heißem Zustande begegnen kann).

Der Agar hat die folgende Zusammensetzung: Agar nach dem Rezepte von *Novy-Mac Neal* und 2% Traubenzucker oder gebräuchlicher Bakterienagar mit 0.5% NaCl und 1% Pepton, schwach alkalisch und 2% Traubenzucker. Die Mischung mit dem Blute und die Kondenswassergewinnung werden in der gleichen Weise vorgenommen wie bei allen Blutagarnährböden.

Hypotonischer Blutagar nach *Ponselle* 1913 zur Züchtung von Fischtrypanosomen. Der in gebräuchlicher Weise mit Kaninchenblut (oder mit einer anderen Blutart) gemischte Agar zeichnet sich durch das Fehlen des Kochsalzes aus. Beim Mischen besonders mit geringen Blutmengen entsteht also ein Nährboden mit niedrigerer Salzkonzentration und geringerem Elektrolytgehalte als das Blut.

Der Agar enthält: Agar 20.0 g, Leitungswasser 1000.0 cm³. Er wird mit der gleichen Menge defibrierten Kaninchenblutes gemischt und in der gebräuchlichen Weise weiterbehandelt.

Der einfache NNN-Agar gibt bei manchen leicht züchtbaren Trypanosomen gute Ergebnisse, versagt aber bei den meisten pathogenen Arten. Seine Zusammensetzung siehe unter Nährböden für Leishmanien!

Stark alkalisierter NNN-Agar nach *Laveran* und *Franchini* 1919 soll dem Trypanosomenwachstum nicht schaden, wohl aber das Bakterienwachstum unterdrücken und sich deshalb für Flagellatenzüchtung aus dem Insektendarme eignen. Da der Darm der Schaf-lausfliege, an dem *Laveran* und *Franchini* diesen Nährboden geprüft haben, außer der *Rickettsia melophagi* *Nöller* 1917, die fast noch schwerer zu züchten ist als das Schaftrypanosoma, keinerlei Bakterien enthält, ist die Empfehlung mit größter Vorsicht aufzunehmen.

Wo das Röhrenverfahren die Trennung der Trypanosomen von Bakterien nicht zuläßt, und wo es sich darum handelt, aus dem nicht bakterienfreien Insektendarme Trypanosomenentwicklungsstufen und verwandte Flagellaten herauszuzüchten, muß zur Züchtung auf festen Nährböden (Platten) gegriffen werden, besonders wenn das indirekte Züchtungsverfahren nach *Maggio* und *Rosenbusch* 1915 (Einspritzung der Insektendarmflagellaten bei gesunden Mäusen und Herauszüchtung aus deren Blut oder inneren Organen) im Stiche läßt.

Nährböden für die Züchtung auf der Oberfläche (für Plattenzüchtung).

Der Traubenzucker-Blutplattenagar nach Nöller 1917. Der Agar setzt sich zusammen aus Agar 10·0 g, Traubenzucker 10·0—20·0 g, schwach alkalische Pferdefleisch-Nährbouillon mit 0·5% NaCl und 1% Pepton 1000·0 cm³. An die Stelle der Pferdefleisch-Nährbouillon kann mit gleichem Erfolge die fertige Bouillon (mit Pepton und Kochsalz versehen; letzteres wird bei der Blutkuchenbouillon weggelassen) aus Blutkuchen nach Szasz 1915 und aus Liebig's Fleisch-extrakt treten. Die fertige Nährbouillon gelangt deshalb zur Anwendung, weil nach Zusatz des Agars jedes überflüssige Kochen vermieden werden soll. Erstes Erfordernis für einen guten Blutplattenagar ist nämlich, daß er mit großem Feuchtigkeitsgehalte eine möglichst große Festigkeit vereinigt und diese wird bekanntlich durch langes Kochen des Agars häufig stark herabgesetzt, wahrscheinlich durch hydrolytische, die Erstarrungsfähigkeit mindernde Vorgänge. Deshalb stellt sich die Agarbereitung wie folgt dar: Die abgewogenen Agar- und Traubenzuckermengen werden in der zugehörigen Bouillonmenge im Dampftopfe oder im Wasserbade nur so lange erhitzt, bis der Agar eben gelöst ist. Es erfolgt sofort das Abfüllen in sterile Röhrchen in Mengen von je 12 bis etwa 18 cm³ und ein halbstündiges Sterilisieren im Dampftopfe. Der Autoklav ist beim Plattenagar ganz zu meiden. Das einmalige Sterilisieren genügt in der Regel, wenn sauber gearbeitet worden ist. Ein Klären des Agars ist ganz überflüssig und unterbleibt aus den gleichen Gründen. Die sterilen Röhrchen werden im Eisschranke am besten in einem luftdicht verschlossenen Gefäße zum Gebrauch aufbewahrt.

Bei der verschiedenartigen Erstarrungsfähigkeit verschiedener Agararten muß jeder zum Plattenagar benutzte Vorrat zunächst auf seine Erstarrungsfähigkeit geprüft werden. Bei schlechteren Handelsmarken muß man im Notfalle einen höherprozentigen (bis 2·5% igen) Ausgangsagar benutzen.

Das Mischen mit dem defibrinierten, durch Aderlaß aseptisch gewonnenen Pferdeblute geschieht in einem sterilen Erlenmeyerkölbchen. Der Agar wird aus dem gut verflüssigten und noch heißen, soeben erst aus dem Dampftopfe oder dem Wasserbade entnommenen Röhrchen in das Mischkölbchen gegossen. Das Röhrchen wird sofort bis zur gleichen Höhe mit dem Blute gefüllt und wieder in das Mischkölbchen entleert. So läßt sich ohne langwierige Messungen eine Zusammensetzung aus gleichen Teilen Agar und Blut erzielen. Durch Schwenken des Kölbchens wird eine innige Mischung erzielt und die fertige Mischung wird nun in die sterilen Platten (das sind am besten Petrischalen von 10 cm Durchmesser und 3 cm Höhe) eingegossen. Blasen sind durch vorsichtiges Neigen der Platten an den Rand zu bringen, wenn sie sich ausnahmsweise nicht ganz vermeiden lassen. Die Oberfläche einer guten

Blutagarplatte muß vollkommen glatt sein, wenn man kleine Trypanosomenkolonien rechtzeitig erkennen will. Die frisch gegossene Platte bleibt bei Zimmertemperatur etwa eine Stunde auf ebener Unterlage stehen, bis sie vollständig erstarrt ist. Dann wird sie zur Erhöhung der Starre einige Stunden in den Eisschrank eingestellt. Die Beimpfung erfolgt noch am Tage der Herstellung oder doch spätestens am folgenden Tage mit Öse oder mit gebogenem dünnen Glasstabe bei Flächenbeimpfung, wenn eine gleichmäßige Verteilung von Ausgangsflüssigkeit über die ganze Platte angestrebt wird. Um das Auffallen von Luftkeimen zu vermeiden, beimpft man die hochgehaltenen Platten am besten von unten, ohne überhaupt die Schichtseite nach oben zu kehren.

Die beimpfte Platte wird umgedreht und die Deckelschale (jetzt also die untere Schale) erhält eine 0·5—0·6 cm hohe Füllung von 2‰iger Sublimatlösung. Die Schale wird beim Einsetzen der den Agar enthaltenden Schale schief gehalten, damit einerseits keine Sublimatspritzer entstehen und anderseits ein Hinauspressen der Sublimatlösung durch die abgesperrte Luft vermieden wird. Ebenso vorsichtig muß man beim Abheben der Schale aus der Sublimatlösung zu Werke gehen. Die Sublimatfüllung ist je nach der Temperatur alle 2—8 Tage zu erneuern. Ihr Zweck ist ein doppelter: Sie dient erstens als ein die feuchte Atmosphäre gewährleistender Luftabschluß und zweitens zur Aufnahme des überschüssigen, an den Wänden der obenstehenden Schale herabfließenden Kondenswassers. Dieses bildet sich besonders in den ersten Tagen in reicher Menge, und da es bei mit gefährlichen menschenpathogenen Trypanosomen beimpften Platten große Mengen der gefährlichen Krankheitserreger enthalten kann, muß es in der keimtötenden Sublimatlösung unschädlich gemacht werden.

Nähere Angaben über die Plattenmethode finden sich bei Nöller 1917.

c) Die Nährböden für Plasmodien und Piroplasmen.

Kultur nach Bass und Johns 1912: Das Malariablut wird dem Patienten mit steriler Spritze aus der Armvene entnommen und 10 cm³ Blut werden in ein Reagensröhrchen eingefüllt, das 0·1 cm³ einer 50%igen Traubenzuckerlösung enthält. In diesem Röhrchen wird das Defibrinieren durch Rühren mit einem sterilen, durch den Wattestopfen gesteckten Glasstab vorgenommen. Das so defibrinierte und mit dem Traubenzucker versehene Blut wird in Röhrchen etwa 5 cm hoch eingefüllt. Nach dem Absetzen der Blutkörperchen steht dann eine Säule von etwa 1·5 cm Serum über den Blutkörperchen. Die Röhrchen werden im Brutschranke bei 40° gehalten, u. zw. unter anaeroben Bedingungen. Das Wachstum erfolgt auf der Oberfläche der Blutkörperchensäule und geht nur 1—2 mm in die Tiefe.

Zur Erzielung von Subkulturen werden Röhrchen mit Menschenserum bis zur Höhe von mindestens 1·5 cm gefüllt und mit sterilen Blut-

körperchen versehen, von denen die Leukocyten durch Zentrifugieren entfernt worden sind. Die Röhrenchen werden durch Einsaat aus der plasmodiumhaltigen Schicht eines Röhrenchens erster Generation beimpft.

Ziemann 1913 hat eine fast gleiche Technik angewandt, und auch bei Verwendung inaktivierten (43%) Serums Erfolge erzielt. Er hält die Röhrenchen bei 37°.

Knuth und *Richters* 1913 haben bei den Piroplasmen dem Hundeblyte wesentlich mehr Traubenzucker zugesetzt, u. zw. einen Teil einer 1—3%igen Traubenzuckerlösung zu 2 Teilen Hundeblyt.

Row 1917 vereinfacht die Züchtungstechnik durch Benutzung von Röhrenchen mit flachem Boden, wodurch eine bessere Ausnutzung der ganzen Blutkörperchenmenge gewährleistet wird.

II. Die Züchtung von parasitischen Würmern auf künstlichen Nährböden.

Schon bei den Sporozoen haben wir darauf verzichten müssen, alle Teile ihrer komplizierten Entwicklung auf künstlichen Nährböden zu verfolgen. Bei den parasitischen Würmern ist diese Aufgabe ebenfalls noch ungelöst. Ihre endgültige Lösung bleibt der Zukunft vorbehalten. Immerhin liegen aber einige Anfänge vor, die die Entwicklung der Larven aus den Eiern zum Gegenstande haben. Die allgemeinen Methoden der Wurmforscher zur Gewinnung der Larvenformen aus den Eiern der Würmer in natürlicher oder halb natürlicher Umgebung gehören zum Gebiete der Wurmforschung und können hier nicht behandelt werden. Die Anfänge der Züchtung auf künstlichen Nährböden wie in der Bakteriologie erstrecken sich durchgehend auf parasitische Fadenwürmer und insbesondere auf die menschlichen Parasiten der Gattungen *Ankylostoma* und *Strongyloides*.

Nissle und *Wagener* 1904 zeigten, daß beim Aufstreichen von Kot mit diesen Wurmeiern auf Platten von 1% Agar (in bloßem Wasser gelöst) die Larven ausschlüpfen und sich auf der Platte fortbewegen. Der bis zur pastösen Beschaffenheit verdünnte Kot wurde von den Forschern in feiner Schicht noch über die ganze Platte verteilt. Dadurch sollte bei Prüfung größerer Kotmengen die Anwesenheit einzelner Wurmeier leicht festgestellt werden. Das Verfahren wurde auch von *Galli-Valerio* 1905 angewandt und gelobt. *Lambinet* 1905 wendet die Agarplatten zur Gewinnung von Larven aus Eiern an, die er aus dem Uterus geschlechtsreifer Würmer entnommen hat, und *Looss* stellt 1911 in seiner Monographie über *Ankylostoma duodenale* alle diese Züchtungsversuche zusammen (S. 308—309).

Einen weiteren Fortschritt stellt die Arbeit von *Hilgermann* und *Weißenberg* 1913 dar. Diese Forscher haben auf Amöbenagarplatten eine Anzahl Fadenwürmer ausgesät, bei nicht parasitären Formen und

bei dem parasitischen Fadenwurm *Rhabdonema nigrovenosum* aus Lunge und Kloake des Grasfrosches die jüngsten Stufen erhalten und die Vorzüge des Plattenverfahrens für eine leichte und gründliche morphologische Untersuchung der auf diese Weise züchtbaren Würmer hervorgehoben. *Fülleborn* endlich 1920 hat das Kulturverfahren auf den Agarplatten bei *Ankylostoma* und *Strongyloides* durchgeprüft und wesentlich vervollkommenet. Er streicht den Kot nicht über die ganze Platte, sondern trägt ihn nur in einem Bezirke in der Mitte auf. Die Larven kriechen nun aus dieser Kotmasse heraus und hinterlassen durch die ihnen anhaftenden Bakterien eine Spur auf oder in der Agarschicht, so daß jede einzelne Larve leicht aufgefunden werden kann (vgl. Tafel III, Fig. 8. u. 9).

Literatur: —. —. — The cultivation of trypanosomes on artificial media. Sleeping Sickness Bureau Bull. 1909, I, S. 287—294, 325—326. — *H. W. Acton* and *R. Knowles*, Studies on the Halteridium parasite of the pigeon, *Haemoproteus columbae* Celli and San Felice. Indian j. med. res. 1914, I, S. 663—690. — *de B. H. Aragao*, Bemerkungen über *Nyctotherus cordiformis* Stein. Mem. do Inst. Osw. Cruz. 1912, IV, S. 125—128. — *R. G. Archibald*, A preliminary report on Kala-Azar in the Sudan. J. R. Army Med. Corps. 1914, XXIII, S. 479—495. — *C. C. Bass*, A new conception of immunity: Its application to the cultivation of protozoa and bacteria from the blood and to therapeutic measures. J. of Am. med. ass. 4. Nov. 1911, S. 1534—1535; On the cultivation of malarial parasites in vitro by preventing the development of complement in the human blood employed. J. trop. med. and hyg. 1911, XIV, Nr. 22; Neue Gesichtspunkte in der Immunitätslehre, ihre Anwendung bei der Kultur von Protozoen und Bakterien im Blute und zu therapeutischen Zwecken. A. f. Trop. 1912, XVI, S. 117—120; Cultivation of malarial plasmodia in vitro. Am. j. of Trop. Dis. and Prevent. Med. 1914, I, S. 546—564; Ref.: Trop. diseases bulletin. III, S. 438—442. — *C. C. Bass* and *F. M. Johns*, The cultivation of malarial plasmodia (*Pl. vivax* and *falciparum*) in vitro. J. of exp. med. 1912, XVI, S. 567—579. — *Th. Bayma*, Molestia de Carlos Chagas (Nota sobre sua verificacao parasitologica no homem em S. Paulo). Rev. med. de S. Paulo 1919, XVII, S. 3. — *H. Bayon*, The cultivation of *Trypanosoma rhodesiense* Stephens and Fantham. Proc. Roy. Soc. Ser. B. 1912, LXXXV, S. 482—483. — *K. Behn*, Wachstum von Bluttrypanosomen aus deutschen Rindern auf Blutagar. Berl. Tierärztl. Woch. 1911, 27. Jahrg., S. 306—307. — *P. Behn*, Gehen die bei Rindern kulturell nachweisbaren Flagellaten aus Trypanosomen hervor? Zt. f. Hyg. u. Inf. 1911, LXX, S. 371—408. — *C. A. Behrens*, An attenuated culture of *Trypanosoma brucei*. J. of Inf. Dis. 1914, XV, S. 24—62. — *E. Bertarelli*, La coltura del parassita malarico. Morgagni. Anno 55 Pte. 2. Riv. 1913, S. 694—699. — *A. Bettencourt* et *C. Franca*, Note sur les trypanosomes des oiseaux du Portugal. Arch. do R. Inst. Bact. Camara Pestana 1907, I, S. 333—336. — *C. Biot*, *R. Biot* et *G. Richard*, Influence de la glucose sur la vitalité du *Trypanosoma lewisi* in vitro. Cpt. rd. soc. biol. 1911, LXXI, S. 368—369. — *W. C. Boeck*, *Chilomastix mesnili* and a method for its culture. J. of exp. med. 1921, XXXIII, S. 147—175. — *A. Böning*, Untersuchungen über das Vorkommen von Trypanosomen bei heimischen gesunden Schafen und in Schaflausfliegen (*Melophagus ovinus*). Inaug.-Diss. Tierärztl. Hochschule Hannover 1920. — *G. Bouet*, Culture du trypanosome de la grenouille (*Tryp. rotatorium*). Ann. Inst. Past. 1906, XX, S. 564—577. — *M. F. Boyd*, A note on the cultivation of *Trichomonas intestinalis*. J. of Parasit. 1918, IV, S. 168—170. — *J. Bronfenbrenner*, A new indicator for direct reading of hydrogen ion concentration in bacterial cultures. J. of med. res. 1918, XXXIX, S. 25—32. — *D. Bruce*, *A. E. Hamerton* and *H. R. Bateman*, A trypanosome from Zanzibar. Proc. Roy.

Soc. Ser. B. 1909, **LXXXI**, S. 14—30. — *D. Bruce, A. E. Hamerton, H. R. Bateman* and *F. P. Mackie*, Trypanosome diseases of domestic animals in Uganda. III. Tr. vivax Ziemann. Proc. Roy. Soc. Ser. B. 1910, **LXXXIII**, S. 1—14. — *D. Bruce, A. E. Hamerton, H. R. Bateman, F. P. Mackie* and *Lady Bruce*, Sleeping sickness investigation in Uganda. XI. rep. of Sleep. Sickness Commission of the Roy. Soc. 1911. — *E. Brumpt*, Inoculation et culture du Tryp. vickersae Brumpt. Culture et essai d'inoculation du Tryp. minasense Chagas. Bull. soc. path. exot. 1909, **II**, S. 395—397; Précis de parasitologie. Masson, Paris 1910, S. 126; Sur quelques particularités morphologiques et physiologiques des trypanosomes perte du flagelle et formation de pigments divers). Bull. soc. path. exot. 1910, **III**, S. 366 bis 367. — *G. Buchanan*, Some observations on Tryp. brucei (pecaudi?) and the Sudan camel trypanosome in cultures, with a note on endoglobular and developmental forms of Tryp. brucei (pecaudi?). Fourth Rep. Wellcome Res. Labor. Khartoum 1911, Bd. A, S. 57—59. — *J. P. Cardamatis* et *S. Photinos*, Trypanosomes dans le sang des bovidés en Grece. Bull. soc. path. exot. 1911, **IV**, S. 377; Des flagellaires dans la mouche domestique. Zbl. f. Bakt., I. Abt., 1912, Orig. **LXV**, S. 66—77. — *A. Carini*, Présence de Trypanosomes chez les bovidés a Sao Paulo. Bull. soc. path. exot. 1911, **IV**, S. 191—192. — *M. Carpano*, Kultur der Pferdepiroplasmen und Betrachtung über die Natur der Anaplasmen. Zbl. f. Bakt., I. Abt., 1914, Orig. **LXXXIII**, S. 42—53. — *de C. A. D. Cerqueira*, Contribução ao estudo dos trypanosomas. Diss. Rio de Janeiro; Ref. Bull. Inst. Past. 1906, **IV**, S. 1041. — *C. Chagas*, Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen. Mem. do Inst. Osw. Cruz 1909, **II**, S. 159—218; Neue Trypanosomen. A. f. Trop. 1909, **XIII**, S. 120—122. — *E. Chatton*, Présence d'un flagellé intestinal du genre Trichomastix dans le sang et les organes du gecko... Culture sur gelose au sang N. N. N. Cpt. rd. soc. biol. 1918, **LXXXI**, S. 343—346; Culture pure et indéfinie d'un flagellé intestinal du genre Trichomastix, sur organes en autolyse aseptique. Cpt. rd. soc. biol. 1918, **LXXXI**, S. 346—349; a) Principaux facteurs physiques qui conditionnent la culture pure des flagellés intestinaux du genre Trichomastix; b) La nutrition de ces flagellés en cultures pures. Simplifications rationnelles de la methode de culture; les tissus coagulés. Cpt. rd. soc. biol. 1918, **LXXXI**, a) S. 714, b) S. 774; Sur la culture pure d'un Leptomonas de la puce du chien et sur un caractères de ses formes culturales qui les distinguent de celles du Kala-Azar de souches humaine et canine. Bull. soc. path. exot. 1919, **XII**, S. 313 bis 316. — *E. Chatton* et *G. Blanc*, Le Leptomonas de la Tarente dans une région indemne de bouton d'orient. Observations et experiences. Bull. soc. path. exot. 1918, **XI**, S. 595—609. — *E. Chatton* et *Lalung-Bonnaire*, Amibe limax (Vahlkampfia n. g.) dans l'intestin humain. Son importance pour l'interprétation des amibes de culture. Bull. soc. path. exot. 1912, **V**, S. 135—143. — *S. Comes*, Quelques observations sur l'hémophagie du Balantidium entozoon Ehr. en relation avec la fonction digestive du parasite. A. f. Protistenk. 1909, **XV**, S. 54—91. — *J. W. Cornwall* and *H. M. La Frenais*, A contribution to the study of Kala-Azar. Ind. j. of med. res. 1916, **III**, S. 689—724. — *H. Crawley*, Trypanosoma americanum, a common blood parasite of American cattle. U. S. Dept. of Agriculture. Bureau of Animal Ind. Bull. 145, 1912, S. 39. — *di G. Cristina* e *S. Cannata*, Sui caratteri morfologici e culturali del parassita dell'anemia splenica infantile (Leishmania infantum). Gazz. d. Osped. e d. Clin. 1910, Nr. 48. — *J. W. Cropper* and *A. H. Drew*, Researches into induced cell reproduction in Amoebae. John Howard Mc Fadden Res. J. Murray, London 1914, **IV**, S. 112. — *D. W. Cutler*, A methode for the cultivation of Entamoeba histolytica (preliminary note). J. of Path. and Bact. 1918, **XXII**, S. 22—27, 1 Taf.; Observations on Entamoeba histolytica. Parasitology 1919, **XI**, S. 127—146. — *B. Danilewsky*, Zur Parasitologie des Blutes. Biol. Zbl. 1885, **V**, S. 529; Matériaux pour servir à la parasitologie du sang. A. slav. de biol. Paris 1886, **I**, S. 85—91, 364—396; Les cultures capillaires. A. slav. de biol. Paris 1886, **I**, S. 48—51; Parasitologie comparée du sang. Charkoff 1888/89. — *P. Delanoc*,

Présence de trypanosomes chez les bovidés en France. Bull. soc. path. exot. 1911, IV, S. 112—116; L'importance de la phagocytose dans l'immunité de la souris à l'égard de quelques flagellés. Thèse Faculté de Méd. Montpellier 1911; Paris: Imprimerie de la Cour d'Appel; Sur l'existence des formes trypanosomes dans les cultures de *Trypanosoma lewisi*. Cpt. rd. soc. biol. 1911, LXX, S. 704—706. — *M. Delanoe* et *Mme P.*, A propos de *Schizotrypanum cruzi*. Bull. soc. path. exot. 1912, V, S. 599. — *F. Doflein*, Experimentelle Studien über die Trypanosomen des Frosches. A. f. Protistenk. 1910, XIX, S. 207—231. — *J. B. Douwes*, Trypanosomen beim Schafe (*Trypanosoma Melophagum* Flu). D. Tierärztl. Woch. 1920, Jahrg. 28, Nr. 47, S. 553—554. — *J. E. Dutton*, *J. L. Todd* and *E. N. Tobey*, Concerning certain parasitic protozoa observed in Africa. Ann. trop. med. and parasit. 1907, I, S. 287—370. — *Rh. Erdmann*, Experimentelle Ergebnisse über die Beziehungen zwischen Fortpflanzung und Befruchtung bei Protozoen, besonders bei *Amoeba diploidea*. A. f. Protistenk. 1913, XXIX, S. 84—127; A new culture medium for protozoa. Proc. Soc. for exp. biol. and med. 1914, XII, S. 57; The life-cycle of *Trypanosoma brucei* in the rat and in rat plasma. Proc. Nat. Acad. of Sc. 1915, I, S. 504—512. — *E. Escomel*, Sur la dysenterie à *Trichomonas* à Aréquipa. Bull. soc. path. exot. 1913, VI, S. 120—122; Tricomonosis intestinal. Ann. Fac. Med. Montevideo 1918, LXXIV, S. 1; La tricomonosis intestinal. Verlag Sanmarti & Co., Lima 1919, S. 78, Fig. 8. — *H. B. Fantham* and *A. Porter*, The significance of certain natural flagellates of insects in the evolution of disease in vertebrates. J. of Parasitology 1916, II, S. 149—166. — *F. Ferber*, Beiträge zur Biologie der nur auf kulturellem Wege nachweisbaren Flagellaten des Rinderblutes. Zt. f. Hyg. u. Inf. 1913, LXXVI, S. 193—203. — *C. Fleig*, Sur la survie du *Tryp. brucei* dans quelques milieux d'origine biologique et non biologique. Cpt. rd. soc. biol. 1911, LXXI, S. 527—529. — *C. Fraenkel*, Beobachtungen an *Crithidia fasciculata*. Hyg. Rundschau 1909, Jahrg. 19, Nr. 2, S. 57—58. — *C. França*, Notes sur la biologie des trypanosomes. A. R. Inst. Bact. Camara Pestana 1909, II, S. 43—49; Le trypanosome de l'anguille (*T. granulorum* Laveran et Mesnil). A. R. Inst. Bact. Camara Pestana 1909, II, S. 113—121; Notes sur la biologie des Hémospodidies. La schizogonie des Hémogregarines. Bull. soc. path. exot. 1918, XI, S. 171—173. — *P. Frosch*, Zur Frage der Reinzüchtung der Amöben. Vorl. Mitteilung. Zbl. f. Bakt., I. Abt., 1897, Orig. XXI, S. 926—932; Beitrag zur Biologie saprophytischer Amöben. Zt. f. Krebsforsch. 1909, VIII, S. 1—12. — *F. Fülleborn*, Über den Nachweis von *Ancylostomum* und *Strongyloides*. Rev. med. Hamburg 1920, Nr. 1. — *G. Fusco*, Osservazioni sulle forme involutive e sulla cultura de tripanosoma (*brucei*). Rif. med. 13. April 1908. — *S. H. Gaiger*, Further observations on trypanosomiasis 1909/10. J. of Trop. Vet. Sci. 1911, VI, S. 21—43. — *B. Galli-Valerio*, Notes de parasitologie et de technique parasitologique. Zbl. f. Bakt., I. Abt., 1905, Orig. XXXIX, S. 230—247. — *A. C. H. Gray* and *F. M. C. Tulloch*, An experiment on the cultivation of *Tryp. gambiense*. Proc. Roy. Soc. Ser. B. 1906, LXXVIII, App. 2, S. 253—254; Reports of the Sleep. Sickn. Comm. of the Roy. Soc. 1907, Nr. 8, S. 133. — *A. G. Gurko* u. *J. Hamburger*, Zur Frage über die Kultur des Plasmodiums der tropischen Malaria nach *Bass* und *Johns*. Zt. f. Hyg. u. Inf. 1913, LXXIV, S. 248—252. — *W. Hagemeister*, Über die Züchtung pathogener Trypanosomen auf künstlichen Nährböden. Zt. f. Hyg. u. Inf. 1914, LXXVII, S. 227 bis 256. — *Hilgermann* u. *R. Weissenberg*, Nematodenzüchtung auf Agarplatten. Zbl. f. Bakt., I. Abt., 1918, Orig. LXXX, S. 467—472. — *A. J. Hinkelmann*, Pathogenicity, cultivation and reproduction of protozoan parasites. New York Med. j. 8. Febr. 1919, S. 234—240. — *C. A. Hoare*, Some observations and experiments on insect flagellates, with special reference to artificial infection of vertebrates. Parasitology 1921, XIII, S. 67—85. — *Irikura*, Ein Beitrag zur Kultivierung der Trypanosomen *Saikingakuzasshi*, Nr. 138. Ref. A. f. Trop. 1907, XIII, S. 383. — *F. M. Johns*, On the adult forms of *Tryp. americanum* in naturally infected animals. Amer. j. trop. diseases a. prevent. med. 1913, I, S. 45—59; *Tryp. ameri-*

canum. New Orleans med. and surg. j. 1914, LXVI, S. 533—534. — *N. M. Joukoff*, Culture du parasite de la malaria. Cpt. rd. soc. biol. 1913, LXXIV, S. 136—138. — *F. K. Kleine*, Beitrag zur Kenntnis des Trypanosoma melophagium Flu. D. Tierärztl. Woch. 1919, 27. Jahrg., Nr. 38, S. 408—410. — *P. Knuth*, Über die in deutschen Rindern gefundenen Trypanosomen. Berl. Tierärztl. Woch. 1910, 26. Jahrg., S. 810—811. *P. Knuth* u. *E. Richters*, Über die Vermehrung von Piroplasma canis auf künstlichen Nährböden. Zt. f. Inf. d. Haustiere 1913, XIV, S. 136 bis 146; Über die Vermehrung von Piroplasma canis in vitro. Berl. Tierärztl. Woch. 1913, 29. Jahrg., Nr. 12. — *P. Knuth* u. *G. Rauchbaar*, Zum Vorkommen von Trypanosomen bei Rindern in Deutschland. Berl. Tierärztl. Woch. 4. Aug. 1910, 26. Jahrg., S. 909. — *P. Knuth*, *G. Rauchbaar* u. *P. Morgenstern*, Nachweis von Trypanosomen beim Rinde im Kreise Oberwesterwald. Vorl. Mitteil. Berl. Tierärztl. Woch. 7. Juli 1910, 26. Jahrg., S. 539. — *M. H. Kuczynski*, Untersuchung von Trichomonaden. A. f. Protistenk. 1914, XXXIII, S. 119—204. — *M. Kühn*, Die Trypanoplasmen und deren Verbreitung in einheimischen und ausländischen Schnecken. Schriften phys. ökon. Ges. zu Königsberg 1911, 52. Jahrg., S. 63—89. — *E. Küster*, Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. 2. Aufl., Teubner, Leipzig 1913. — *J. Lambinet*, Recherche sur le mode d'infection de l'organisme animal par les larves d'Anchylostomes. Bull. Acad. r. méd. Belgique. Sitz. v. 25. Juli 1905. — *A. Laveran*, Au sujet de Trypanosoma congolense Broden. Bull. soc. path. exot. 1909, II, S. 526—529; Leishmanioses. Kala-Azar. bouton d'orient. leishmaniose américaine. Masson, Paris 1917, S. 524. — *A. Laveran* et *F. Mesnil*, Trypanosomes et trypanosomiases. 1. Aufl., Masson, Paris 1904, 2. Aufl., 1912. — *A. Laveran* et *G. Franchini*, Infection des souris blanches à l'aide des cultures de Herpetomonas etenocephali. Bull. soc. path. exot. 1919, XII, S. 379; Sur les flagellés parasites de quelques insectes et sur les infections qu'ils peuvent produire chez les souris. Bull. soc. path. exot. 1919, XII, S. 665—671; Sur quelques flagellés d'insectes obtenus en culture pure et en particulier sur Crithidia melophagi. Cpt. rd. Acad. Sc. 1919, CLXIX, S. 153—155; Contribution à l'étude des flagellés des culicides, des muscides, des phlebotomes et de la Blatte orientale. Bull. soc. path. exot. 1920, XIII, S. 138—147; Contributo allo studio della flagellosi delle enforbie. Pathologica 1921, XIII, S. 147—150. — *A. Laveran* et *A. Pettit*, Culture de la Leishmania donovani en milieu liquide 1910, LXVIII, S. 114 u. 276. — *C. H. Lavinder*, A note on the cultivation of malarial plasmodia after the method of Bass and Johns. J. amer. med. Assoc. 1913, LX, S. 42—43. — *C. Lebaillly*, Recherches sur les hématozoaires parasites des Téléostéens marins. A. de parasit. 1906, X, S. 348—404, bes. S. 392. — *W. B. Leishman* and *J. C. B. Statham*, The development of the Leishman body in culture. J. Roy. Army med. Corps. 1905, IV, S. 321—334. — *J. Lewis* and *H. U. Williams*, The results of attempt to cultivate trypanosomes of frogs. Am. Med. 25. März 1905, IX, S. 491. — *A. Looss*, The anatomy and life-history of Anchylostoma duodenale Dub. A monograph. Records of the School of Medicine, Cairo 1911, IV, S. 308—309. — *K. M. Lynch*, Trichomonas of the vagina and the mouth. Cultivation of the causative organism and experimental infection (A preliminary communication). Am. J. Trop. Dis. and Prev. Med. 1915, II, S. 627—634. — *W. J. Mac Neal*, An improved medium for cultivating Trypanosoma brucei. Sixth Annual Report of the Michigan Academy of Science 1904, S. 173—178; The life-history of Trypanosoma lewisi and T. brucei. J. of inf. dis. 1904, I, S. 517—543. — *W. J. Mac Neal* and *F. G. Nory*, On the cultivation of Trypanosoma lewisi. Contributions to Medical Research, dedicated to T. C. Vaughan. Michigan 1903, S. 549—577. — *C. Maggio* und *F. Rosenbusch*, Studien über die Chagaskrankheit in Argentinien und die Trypanosomen der „Vinchuas“ (Wanzen. Triatoma infestans Klug). Zbl. f. Bakt., I. Abt., 1915, Orig. LXXVII, S. 40—46. — *L. Manceaux*, Sur la technique de culture des Leishmania. Bull. soc. path. exot. 1911, IV, S. 286—288. — *C. H. Martin*, Further observations of the intestinal Trypanoplasmas of fishes, with a note on the division of Trypano-

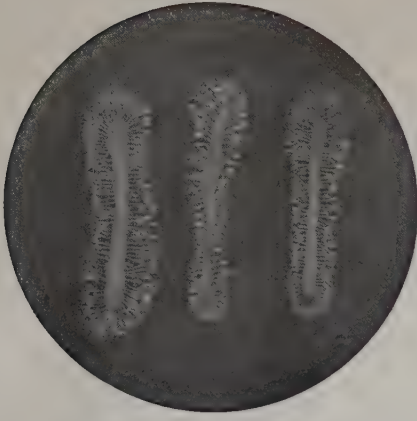
plasma cyprini in the crop of a leech. Quart. J. Micr. Sc. 1913, **LIX** (Neue Serie), S. 175—195, 2 Taf. — *E. Martini*, Über die Entwicklung eines Rinderpiroplasmas und -trypanosomas in künstlichen Nährböden. Zt. f. Hyg. 1909, **LXIV**, S. 385—410; The development of a Piroplasma and Trypanosoma of cattle in artificial culture media. Philippine J. of Sc. Sect. B. Medical Sc. 1909, S. 147—169; Über die Entwicklung von Malariaiparasiten im Bassschen Nährboden. Zbl. f. Bakt., I. Abt., 1914, Orig. **LXXIV**, S. 250—254. — *C. Mathis*, Sur une modification au milieu de Novy-Mac Neal pour la culture des trypanosomes. Cpt. rd. soc. biol. 1906, **LXI**, S. 550—552. — *M. Mayer*, Über ein Halteridium und Leucocytozoon des Waldkauzes und deren Weiterentwicklung in Stechmücken. A. f. Protistenk. 1911, **XXI**, S. 232—254. — *M. Mayer u. H. da Rocha-Lima*, Zum Verhalten von Schizotrypanum cruzi in Warmblütern und Arthropoden. A. f. Trop. 1914, **XVIII**, S. 257 bis 292. — *P. Mendeleyeff-Goldberg*, Die Immunitätsfrage bei der Trypanosomenkrankheit der Frösche. A. f. Protistenk. 1913, **XXXI**, S. 241—267. — *D. Mezincescu*, Les trypanosomes des moustiques et leurs relations avec les Hémoproteus des oiseaux. Cpt. rd. soc. biol. 1908, **LXIV**, S. 975—976; Leucocytozoon ziemanni et trypanosomes chez l'épervier (Falco nisus). Cpt. rd. soc. biol. 1909, **LXVI**, S. 328. — *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. Ihre Bedeutung für die Biologie und die Methoden ihrer Messung. J. Springer, Berlin 1914. — *J. R. Mohler*, Dourine of horses: Its cause and suppression. U. S. Dept. of Agricult.: Bur. of Animal Industry. Bull. 142, S. 38. — *H. Mouton*, Recherches sur la digestion chez les amibes et sur leur diastase intracellulaire. Ann. Inst. Pasteur 1902, **XVI**, S. 457—509. — *J. Müller u. H. Simons*, Der Einfluß des Hungers auf den Verlauf einer Trypanosomeninfektion. Zt. f. Biol. 1919, **LXX**, S. 231—244. — *W. E. Musgrave* and *M. T. Clegg*, Amebas: Their cultivation and etiologic significance. Dept. of the interior Bur. of Governm. Laboratories. Biological Laboratory. Manila Okt. 1904, Nr. 18. — *Ch. Nicolle*, Isolement et culture des corps de Leishman. A. Inst. Pasteur de Tunis 1908, **II**, S. 55—57. — *Ch. Nicolle* et *Ch. Comte*, Sur un trypanosome d'une chauve souris. A. Inst. Pasteur de Tunis 1908, **II**, S. 55—57. — *Ch. Nicolle* et *L. Manceaux*, Culture de Leishmania tropica sur milieu solide. Cpt. rd. soc. biol. 1911, **LXX**, S. 712—713. — *O. Nieschultz*, Bijdrage tot de kennis van eenige vogeltrypanosomen (Voorloopige mededeeling). Tijdschrift voor diergeneeskunde 1921, **XLVIII**, H. 18, S. 4. — *A. Nissle* u. *O. Wagener*, Zur Untersuchungstechnik von Eiern und Larven des Ancylostomum duodenale. Hyg. Rundschau 1904, **XVI**, S. 57—60. — *B. Nocht*, Bemerkung zu der Arbeit von Prof. Ziemann, „Weiteres über die Züchtung der Malariaiparasiten und der Piroplasmen in vitro“. A. f. Trop. 1914, **XVIII**, S. 166—167. — *B. Nocht* u. *M. Mayer*, Trypanosomen als Krankheitserreger. In Kolle-Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 1. Erg., Fischer, Jena 1907. — *W. Nöller*, Die Blutprotozoen des Wasserfrosches und ihre Übertragung. 1. Teil. Archiv für Protistenk. 1913, **XXXI**, S. 169—240; Die Übertragung des Trypanosoma theileri Laveran 1902. Berl. Tierärztl. Woch. 1916, 32. Jahrg., S. 457—460; Blut- und Insektenflagellatenzüchtung auf Platten. A. f. Trop. 1917, **XXI**, S. 53—94; Neue Züchtungsergebnisse bei Blut- und Insektenparasiten. Vortragsbericht. Berl. kl. Woch. 1917, 54. Jahrg., Nr. 14, S. 346—348; Zur Verbreitung des Schaftrypanosomas bei heimischen Schafen. D. Tierärztl. Woch. 1919, 27. Jahrg., Nr. 32, S. 327 bis 328; Die neueren Ergebnisse der Hämoproteusforschung. A. f. Protistenk. 1920, **XLI**, S. 149—168; Neuere Forschungen auf dem Gebiete der Trypanosomenzüchtung. A. f. Tropenhyg. 1920, **XXIV**, S. 168—172. — *W. Nöller*, *K. Krosz* u. *A. Arndt*, Die Rhizopodenfauna des Pferdekotes und des Straßenstaubes in ihren Beziehungen zu Darmparasiten des Menschen. A. f. Tropenhyg. 1921, **XXV**, S. 114—120. — *F. G. Novy*, Immunity against trypanosomes. Proc. soc. for exp. biol. and med. 1907, **IV**, S. 42—44. — *F. G. Novy* und *W. J. Mac Neal*, The cultivation of Trypanosoma brucei: a preliminary note. J. Am. Med. Ass. 21. Nov. 1903, **XLV**; On the cultivation of Trypanosoma brucei. J. of Inf. Dis. 1904, **I**, S. 1—30;

On the trypanosomes of birds. J. of Inf. Dis. 1905, **II**, S. 256—308. — *F. G. Novy, W. J. Mac Neal and C. B. Hare*, The cultivation of the surra trypanosome of the Philippines. J. Am. Med. Ass., Jahrg. 1904, 28. Mai. — *F. G. Novy and R. E. Knapp*, Isolation of trypanosomes from accompanying bacteria. J. of Hyg. 1906, **VI**, S. 111. — *F. G. Novy, W. J. Mac Neal and H. N. Torrey*, The trypanosomes of mosquitoes and other insects. J. of Inf. Dis. 1907, **IV**, S. 223—276. — *F. G. Novy, W. A. Perkins and R. Chambers*, Immunisation by means of cultures of *Trypanosoma lewisi*. J. of Inf. Dis. 1912, **XI**, S. 411—426. — *R. Oehler*, Amöbenzucht auf reinem Boden. A. f. Protistenk. 1916, **XXXVII**, S. 175—190; Flagellaten- und Ciliatenzucht auf reinem Boden. A. f. Protistenk. 1919, **XL**, S. 16—26; Gereinigte Ciliatenzucht. A. f. Protistenk. 1920, **XLI**, S. 34—49. — *T. Ohira and H. Noguchi*, The cultivation of *Trichomonas* of the human mouth (*Tetratrichomonas hominis*). J. exp. Med. 1917, **XXV**, S. 341—347, 4 Taf. — *Olpp*, Die Reinkultur von Malariaplasmodien nach *Bass* und *Johns*. M. med. Woch. 1912, 59. Jahrg., S. 2623—2625. — *G. I. Perekropoff*, Über Kulturen der Plasmodien des tropischen Fiebers (*Malaria tropica*). A. f. Protistenk. 1914, **XXXV**, S. 139—153. — *P. L. Pitschugin*, Kultivierungsversuche mit Plasmodium vivax nach der Methode von *Bass*. Zbl. f. Bakt., I. Abt., 1914, Orig. **LXXIII**, S. 373—384. — *G. Pittaluga e S. de Buen*, Nota sobre los dipteros del genero *Phlebotomus* en Espana. Bol. Inst. Nac. Higiene de Alfonso XIII. 1917, **XIII**, S. 137—145. — *A. Ponselle*, Recherches sur la culture in vitro du *Trypanosome* de l'anguille (*Tryp. granulosum* Laveran et Mesnil 1902). Cpt. rd. soc. biol. 1913, **LXXIV**, S. 339—341; Sur la culture in vitro du trypanosome de l'anguille (*Tryp. granulosum* Laveran et Mesnil 1902). Une nouvelle modification au milieu de *Novy* et *Mac Neal*. Cpt. rd. soc. biol. 1913, **LXXIV**, S. 339 bis 341 u. 522—524; Culture in vitro du *Trypanoplasma varium* Leger. Cpt. rd. soc. biol. 1913, **LXXIV**, S. 685—688; Déterminisme de la culture du trypanosome de la grenouille, *Tryp. rotatorium* Mayer 1843. Cpt. rd. soc. biol. 1917, **LXXX**, S. 824; Sur la culture des trypanosomes. Cpt. rd. soc. biol. 1919, **LXXXII**, S. 163; Détermination de la reaction des milieux de culture par la mesure de la concentration en ions hydrogène. Bull. Inst. Pasteur 1920, **XVIII**, S. 601—610. — *S. v. Prowazek*, Zur Kenntnis der Balantidiosis. A. f. Trop. 1913, **XVII**, Beihefte, S. 371—390; Infusoria-Ciliata. In *Prowazek*, Handbuch der pathogenen Protozoen. Lief. VI, 1914, S. 842—874. — *Richters*, Über die Entwicklung von *Dictyocaulus* (*Strongylus*) *filaria* Rud. beim Schaf. (Plattenzüchtung der Larven!) Berl. Tierärztl. Woch. 1920, **XXXVI**, S. 456/57. — *M. Robertson*, Transmission of flagellates living in the blood of certain freshwater fishes. Philosophical transactions of the roy. soc. of London 1911. Ser. B. **CCII**, S. 29—50. — *H. da Rocha-Lima u. H. Werner*, Über die Züchtung der Malariaparasiten nach der Methode von *Bass*. A. f. Trop. 1913, **XVII**, S. 541—551. — *L. Rogers*, On the development of flagellated organisme (trypanosomes) from the spleen protozoic parasite of cachexial fevers and Kala-Azar. Quart. J. Micr. Sc. 1904. New ser. **XLVIII**, S. 367—377. — *F. Rosenbusch*, Kern und Kernteilung bei Trypanosomen und Halteridium. A. f. Trop. 1908, **XII**, Beiheft 5, S. 152—155; Trypanosomenstudien. Archiv für Protistenkunde 1909, **XV**, S. 263. — *D. Roudsky*, Sur l'inoculation des cultures de *Tryp. lewisi*. Kent au rat blanc et sur la réceptivité de la souris blanche a ce trypanosome. Cpt. rd. soc. biol. 1910, **LXVIII**, S. 421; Sur le *Trypanosoma lewisi* Kent renforcé. Cpt. rd. soc. biol. 1910, **LXIX**, S. 384; Sur la possibilité de rendre le *Tryp. lewisi* virulent pour d'autres rongeurs que le rat. Cpt. rd. acad. sc. 1911, **CLII**, S. 56—58. — *R. Row*, A simple haemoglobinized saline culture medium for the growth of *Leishmania* and allied Protozoa. Brit. medic. j. Jahrg. 1912, **I**, Nr. 2681, S. 1119—1120; On a simplified technique of *Bass'* method of cultivating malarial parasites in vitro and a few observations on the malarial parasites cultured by this technique. The Indian j. of med. research 1917, **IV**, S. 388—392. — *J. Sabracès et L. Muratet*, Trypanosome de l'anguille. Processus de division. Cpt. rd. soc. biol. 1904, **LVI**, S. 66—68. — *G. Sangiorgi*, Sulla cultura in vitro dei protozoi dell'intestino

umano. *Pathologica* 15. Nov. 1918, X, Nr. 240, S. 255—258. — K. Schern, Über die Wirkung von Serum und Leberextrakten auf Trypanosomen. *Arb. a. d. Kais. Ges.* 1911, XXXVIII, S. 338—367. — W. v. Schuckmann u. K. Wernicke, Einiges über Methoden und Ergebnisse der Trypanosomenzüchtung. *Zbl. f. Bakt., I. Abt.*, 1913, Orig. LXVIII, S. 241—255. — A. Senéz, Un nuevo Balantidium. *Bol. del Labor. de Bacter. de Tucuman (Rep. Argentina)* 1918, I, S. 30—36. — Edm. Sergent et Ét. Sergent, Etudes sur les hématozoaires des oiseaux. *Plasmodium relictum; Leucocytozoon ziemanni et Haemoproteus noctuae; Haemoproteus columbae; Trypanosoma de l'hirondelle.* Algerië 1906 und *Ann. Inst. Pasteur* 1907, XXI, S. 251—277, 280; Présence de trypanosomes chez les bovidés en Algérie. *Bull. soc. path. exot.* 1911, IV, S. 40—42. — Edm. Sergent, Ét. Sergent, M. Bequet et A. Plantier, Sur la culture in vitro du parasite du paludisme, d'après la methode de Bass. *Cpt. rd. soc. biol.* 1913, LXXV, S. 324—326. — Edm. Sergent, Lemaire et Senevet, Insecte transmetteur et reservoir de virus du clou de Biskra. *Bull. soc. path. exot.* 1914, VII, S. 577. — H. Simons, Beiträge zur Kenntnis der experimentellen Nagana. *Zt. f. Hyg.* 1918, LXXXVII, S. 1—60. — R. D. Smedley, The cultivation of Trypanosomata. *J. of Hyg.* 1905, V, S. 24—46. — N. H. Swellengrebel, Présence de trypanosomes chez les bovidés en Hollande. *Bull. soc. path. exot.* 1911, IV, S. 536—539. — A. Szasz, Ein billiger Nährboden (Bouillon) aus Blutkuchen. *Zbl. f. Bakt., I. Abt.*, 1915, Orig. LXXV, S. 489—495; Ein einfaches Verfahren zur Bouillonbereitung aus Blutkuchen. *Zbl. f. Bakt., I. Abt.*, 1915, Orig. LXXXVII, S. 111—112. — Thiroux, Recherches morphologiques et expérimentales sur Trypanosoma paddae Laveran et Mesnil. *Ann. Inst. Pasteur* 1905, XIX, S. 65—83; Recherches morphologique et expérimentales sur Trypanosoma duttoni Thirou X. *Ann. Inst. Pasteur* 1905, XIX, S. 564—572. — H. W. Thomas and A. Breinl, Report on trypanosomes, trypanosomiasis and sleeping sickness, being an experimental investigation into their pathology and treatment. *Liverpool School of Tropical Med.* 1905, Memoir 16, S. 43. — J. D. Thomson, Cultivation of the trypanosome found in the blood of the gold-fish. *J. of Hyg.* 1908, VIII, S. 75—82. — J. G. Thomson, The cultivation of Trypanosoma rhodesiense. Preliminary note. *Ann. Trop. Med. and Parasit.* 1912, VI, S. 103—106. — J. G. Thomson and H. B. Fantham, The culture of Babesia (Piroplasma) canis in vitro. *Ann. trop. med. parasit., Liverpool* 1913, VII, S. 621—632. — J. G. Thomson, S. W. Mac Lellan and R. Ross, The cultivation of one generation of malaria parasites (*Plasmodium falciparum*) in vitro by Bass' method. *Ann. trop. med. parasit., Liverpool* 1912, VI, S. 449—462. — J. G. Thomson and J. A. Sinton, The morphology of Tryp. gambiense and Tryp. rhodesiense in cultures: and a comparision with the developmental forms described in *Glossina palpalis*. *Ann. trop. med. parasit., Liverpool* 1912, VI, S. 331—356. — J. G. Thomson and D. Thomson, The cultivation of one generation of benign tertian malarial parasites (*Plasmodium vivax*) in vitro by Bess' method. *Ann. trop. med. parasit., Liverpool* 1913, VII, S. 153—164; The grows and sporulation of the benign and malignant tertian malarial parasites in the culture tube and in the human host. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* LXXXVII, S. 77—87 und *Ann. trop. med. parasit., Liverpool* 1913, VII, S. 509—524. — H. Toyoda, Züchtungsversuche mit Babesia canis nach der Bassettschen Methode. *Zbl. f. Bakt., I. Abt.*, 1913, Orig. LXXII, S. 76—81. — O. Trautmann, Über das kulturelle und serologische Verhalten des Trypanosoma theileri. *Inaug.-Diss. der Tierärztl. Hochschule Berlin* 1921. — J. Tsujitani, Über die Reinkultur der Amöben. *Zbl. f. Bakt., I. Abt.*, 1898, Orig. XXIV, S. 666—670. — E. E. Tyzzer and E. L. Walker, A comparative study of Leishmania infantum of infantile Kala-Azar and Leptomonas (Herpetomonas) ctenocephali parasitic in the gut of the dog flea. *J. med. research* 1919, XL, S. 129—176. — E. Ungermann, Züchtung der Weilschen Spirochäte, der Recurrens- und Hühnerspirochäte sowie Kulturversuche mit der Spirochaeta pallida und Trypanosomen. *Arb. a. d. kais. Ges.* 1918, LI, S. 114—158. — A. Vrijburg, Einige Untersuchungen über Babesia

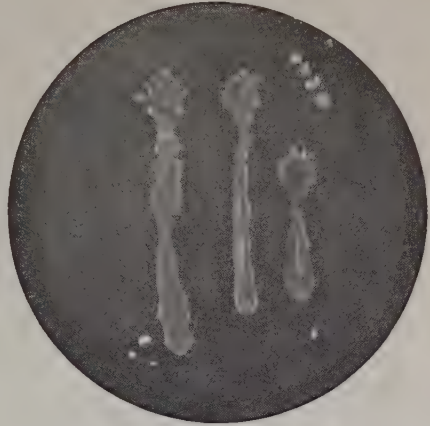
bigemina. Zt. f. Inf. d. Haustiere 1913, XIII, S. 180—186. — *E. L. Walker*, The parasitic Amoebae of the intestinal tract of man. J. Med. Res. 1908, XVII, S. 379—459; The cultivation of the parasitic Flagellata and Ciliata of the intestinal tract. J. Med. Res. 1908, XVIII, S. 487—495; Sporulation in the parasitic Ciliata. A. f. Protistenk. 1909, XVII, S. 297; Trypanosoma ranae n. sp. and its life-cycle in cultures. J. of Med. Res. 1910, XXIII, S. 391; A comparative study of the amoebae in the Manila water supply, in the intestinal tract of healthy persons and in amoebic dysentery. Philippine j. of sc. 1911, VI, S. 259—277. — *Th. v. Wasielewski* und *A. Kühn*, Untersuchungen über Bau und Teilung des Amöbenkernes. Zool. Jahrb. 1914, Abt. Anat. XXXVI, S. 253—326. — *Th. v. Wasielewski* u. *G. Wülker*, Die Hämoproteusinfektion des Turmfalken. Archiv für Tropenhygiene 1918, XXII, Beiheft 2, S. 117—212. — *R. T. Wells*, Aerial contamination as a fallacy in the study of amoebic infections by cultural methods. Parasitology 1911, IV, S. 204—218. — *C. M. Wenyon*, Observations on the natural flagellates of fleas, including a confirmation of Nöller's important results on the transmission of Tryp. lewisi by the dog flea. Report of the Advisory Committee for the Tropical Diseases Research Fund. 1912. Rep. of the Protozoologist of the London School of Tropical Medicine. S. 3—5; Cultivation of the organism causing South American Leishmaniasis. Report of the advisory committee for the tropical diseases research fund. Report of the protozoologist of the London School of Trop. Med. 1912; Experiments on the behaviour of Leishmania and allied flagellates in bugs and fleas, with some remarks on previous work. J. of the London School of Trop. Med. 1912, II, S. 13—26; Observations on Herpetomonas muscae domesticae and some allied flagellates. A. f. Protistenk. 1913, XXXI, S. 1—36. — *E. R. Whitmore*, Studien über Kulturamöben aus Manila. A. f. Protistenk. 1911, XXIII, S. 81—93. — *A. W. Williams*, Pure cultures of parasitic amebas on brainstreaked agar. Proc. soc. exp. biol. and med. 1911, VIII, S. 56 bis 58; Pure cultures of amebae parasitic in mammals. J. of med. res. 1911, XX, S. 263—283. — *G. Wülker*, Die Technik der Amöbenzüchtung. Zbl. f. Bakt., I. Abt., 1911, Ref., L, S. 571—610. — *W. L. Yakimoff* et *N. Kohl-Yakimoff*, Sur la présence de trypanosomes dans le sang des bovidés a Tunis. Bull. soc. path. exot. 1911, IV, S. 309. — *K. Yoshida*, The encystment of dysentery amoebae in vitro. J. of exp. Med. 1918, XXVIII, S. 387—413; Reproduction in vitro of Entamoeba tetragena and E. coli from their cysts. J. of exp. med. 1920, XXXII, Nr. 3, S. 357—379. — *H. Ziemann*, Über die Kultur der Malariaparasiten und der Piroplasmen (Piroplasma canis) in vitro. A. f. Trop. 1913, XVII, S. 361—391 und Berl. klin. Woch. 1913, 50. Jahrg., S. 752; Über die Basssche Kultur der Malariaparasiten (in vitro) und die daraus sich ergebenden Resultate. Zbl. f. Bakt., I. Abt., 1913, Orig. LXVII, S. 482—489; Über die künstliche Weiterentwicklung (in vitro) des Tertian-Malariaparasiten. D. med. Woch. 1913, 39. Jahrg., S. 260, 373, 673—674; Weiteres über die Züchtung der Malariaparasiten und der Piroplasmen (Piroplasma canis) in vitro. A. f. Trop. 1914, XVIII, S. 77, 99, 132 und 166—167.

Fig. 6.



Tryp. theileri (Rindertrypanosoma). Eintägige Platte.
Sehr schnellwüchsig. Ausläufer recht zart. Kon-
traste in der Zeichnung stärker hervorgehoben.

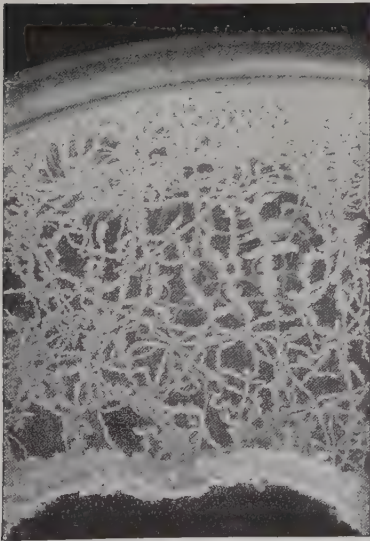
Fig. 7.



Leishmania donovani, alte 30tägige Platte.
(Außerdem 9 runde Kolonien von Luft-
keimen auf der Platte.)

Fig. 1—7. Originale, von *Sikora* gezeichnet.

Fig. 8.



Ankylostomum = Kotkohlekultur. Der
mit Kohle vermischte Wurmstuhl ist auf die
Mitte der Platte aufgetragen. Die Wurm-
larven wandern auf die Agarfläche heraus
und hinterlassen Bakterienspuren.
Vergr. 2 : 1. Nach *Fülleborn* 1920.

Fig. 9



Strongyloides = Larve, auf Bak-
terienrasen Furchen ziehend.
Vergr. 25 : 1 Nach *Fülleborn* 1920.

Fig. 8 u. 9. Kotkohlekultur (Spurenplatten) von *Ankylostomum*- und *Strongyloides*-Wurmlarven
nach *Fülleborn* 1920.

Differentialdiagnostische Nährböden: Arten und Herstellung.

Von Prof. Dr. W. v. Drigalski, Halle.

Allgemeines.

Nicht nur die verschiedenen Verfahren, Mikroorganismen einer bestimmten Art rein zu züchten, gehen noch heute größtenteils auf *Robert Kochs* Methoden zurück, er war auch einer der Ersten, die besondere Nährböden suchten und fanden, auf denen infolge besonderer Wachstumsbedingungen bestimmte Keime durch bestimmte Wachstumsäußerungen von anderen sich unterscheiden. Noch immer gehört außer mikroskopischer Untersuchung und serologischen Unterscheidungsverfahren (Agglutination, Bakteriolyse, Komplementbindung u. s. w.) die Prüfung der Lebensäußerungen fraglicher Kulturen mit Hilfe der differentialdiagnostischen Nährmedien zu den wesentlichsten Mitteln, eine Art festzustellen. Man benutzt dazu

I. vorgebildete Nährmittel, die vermöge ihrer natürlichen Zusammensetzung und der Reaktion gewisse Wachstumsunterschiede bedingen, z. B. die schon von *R. Koch* angegebene Kartoffel, oder mit künstlichen Zusätzen versehene, welche gewissen Arten gegenüber elektiv wirken;

II. Nährmittel, deren eiweißhaltige Bestandteile durch Bakterienenzyme charakteristische Veränderungen erfahren: blut- und milchhaltige Nährböden;

III. solche mit chemischen Zusätzen, welche Oxydations- oder Reduktionswirkungen der Bakterienkulturen anzeigen;

IV. Nährmedien mit einem Gehalt von Zuckern oder mehrwertigen Alkoholen, welche mit Veränderung der chemischen Reaktion von gewissen Mikroorganismen angegriffen, von anderen unverändert gelassen werden.

Bei Beobachtung dieser feineren Lebensäußerungen, die größtenteils Enzymwirkungen sind, ist die Zusammensetzung und Reaktion der Nährmedien von Bedeutung. Bei Bereitung der fleischsafthaltigen (Nährbouillon, -gelatine, -agar u. s. w.) sind Art und Behandlung des Fleisches nicht gleichgültig, wenn es auf die Prüfung des Gärvermögens ankommt. Der Muskelzucker, nach dem Tode durch Verzuckern des stärkeähnlichen Glykogens im tieri-

schen Muskel entstehend, ist nach *O. Hammarsten*¹ hauptsächlich Maltose, nach *F. Röhmnn*², der hierbei *A. Panormoff*³ folgt, vorwiegend Traubenzucker. Beide werden z. B. durch den *Bac. typhi* angegriffen, und *W. v. Drigalski* konnte sich davon überzeugen, daß auf einem aus fettem Pferdefleisch frisch bereiteten Agar mit Lackmuszusatz Typhusbacillen vorübergehend rötliche Kolonien bilden. Man war daher darauf bedacht, glukosefreie Nährböden durch eine Behandlung des Fleisches zu erzielen, welche jenen Zucker auf dem Wege der Vergärung fortschaffte, indem man das Fleischinfus nicht 12 Stunden, sondern zwei Tage bei 10—15° stehen ließ; es findet unter Bildung von Milchsäure eine bakterielle Zersetzung des Zuckers statt. So ist man nicht auf Beachtung des Hinweises von *Smith* angewiesen, der nur bei schlecht genährten Tieren das Fleisch zuckerfrei fand. Die von *Beijerinck*⁴ festgestellte Abspaltung von Zuckerspuren aus Agar-Agar beim Kochen wirkt kaum jemals störend, da sie bei der weiteren Nährbödenbehandlung wohl fast immer verschwindet. Zur Erzielung eines wachstum begünstigenden, muskelzuckerfreien und sparsam herzustellenden Nähragars u. s. w. empfehle ich besonders für kohlehydrathaltige Nährmedien folgendes Verfahren: das durch den Fleischwolf getriebene Fleisch (ein Pfund) wird mit Wasser (am besten destilliertem, 1000 cm³) übergossen und bleibt im Winter bei (nicht hoher) Zimmertemperatur drei Tage lang, im Sommer zwei Tage in kühlem Raum stehen. Fleischwasser kräftig abpressen, zu Bouillon u. s. w. in der üblichen Weise verarbeiten (Agar u. s. w. „I“, sehr stickstoffreich, zuckerfrei). — Das ausgepreßte Fleisch wird abermals mit der doppelten Gewichtsmenge Wasser übergossen, in gleicher Weise stehen gelassen; kräftig abpressen, am besten in der Fleischpresse (Agar u. s. w. „II“, noch ziemlich üppiges Wachstum ermöglichend, ganz zuckerfrei). — Das Fleisch kann zum drittenmal verwendet werden in gleicher Weise, Fleischsaft abpressen mit der Fleischpresse! Zubereitung zu Agar u. s. w. „III“; für das Wachstum weniger empfindlicher Kulturen, wie *Koli*, Typhus u. s. w. noch ausreichend. Üppigkeit des Wachstums im allgemeinen immer noch der mit Fleischextrakt- oder Trocken-Nähragar-Präparaten zu erzielenden gleichwertig.

Die Reaktion muß besonders bei kohlehydrathaltigen Nährböden sorgfältig eingestellt werden. Am besten alkalisieren bis zum Lackmusneutralpunkt mit Natronlauge, Herstellung schwach alkalischer Reaktion mit Natriumcarbonat. Kohlehydrate, insbesondere Milchzucker, sollen nie in stark alkalischer Lösung gekocht werden! Gewisse Zuckerarten zersetzen sich beim Kochen mit Alkali⁵ unter Bildung von Säure, meist Milchsäure; *E. Seitz*⁶ wies nach, daß die Säurebildung aus Milchzucker beim Kochen in alkalischer Lösung mit Steigerung des Alkalizusatzes zunimmt! Verfasser⁷ hat diese Säurebildung bei Erhitzung schon 10 Jahre vorher gesehen und beachtet. Nach Möglichkeit hat man also auch die Dauer der Erhitzung zu begrenzen.

Bestimmte Indikatoren zeigen saure Gärung bzw. Zersetzung von Kohlehydraten und mehrwertigen Alkoholen oder aber vorwiegende Alkalibildung durch Farbumschlag an: Lackmus (Azolithmin), Orcein, Rosolsäure, Fuchsin, Methylorange; andere werden durch entstehende Säure gelöst und bewirken Aufhellung des durch sie zunächst getrübten Nährbodens: Kreide; wieder andere werden durch Säurebildung ausgefällt: Harnsäure, Serum. Am gebräuchlichsten sind die Farbstoffindikatoren.

Eine elegante Methode zur Feststellung der Reaktion durch Bestimmung der Konzentration der Wasserstoffionen hat *L. Michaelis*⁴⁴ angegeben. Er benutzt als Indikatoren schwache Säuren, nitrierte Phenole, welche in undissoziiertem Zustand farblos, als Ionen gelb sind. Da der Dissoziationsgrad dieser Indikatoren von der Wasserstoffionenkonzentration abhängt, kann man aus dem Grad der Gelbfärbung, den eine gegebene Menge eines solchen Indicators in einer beliebigen Flüssigkeit annimmt, einen Schluß auf die H-Ionenkonzentration dieser Flüssigkeit ziehen.

Die H-Ionenkonzentration wird zweckmäßig nicht als solche, sondern in Form ihres Logarithmus mit fortgelassenem Minuszeichen, in Form des „Wasserstoffexponenten“ p_h angegeben. Dieses p_h ist die Summe zweier Größen, p_k , einer für den jeweiligen Indicator charakteristischen Konstante, und q , einer Größe, die in einer bestimmten, aus Tabellen zu entnehmenden Weise von dem Farbgrad F abhängig ist. F ist das Verhältnis derjenigen Farbstoffmenge, welche man einer stark alkalischen Lösung (z. B. $n/100$ -Natronlauge) zusetzt, zu derjenigen Farbstoffmenge, welche man der zu untersuchenden Lösung zusetzen muß, um sie ebenso stark zu färben wie die Lauge.

Die Größe p_h (Exponent der Wasserstoffionenkonzentration) ist äußerst einfach nach der Schnellmethode von *Michaelis*⁸⁵, zu finden, welche mit ein- für allemal berechneten Vergleichslösungen arbeitet, auf denen p_h ohneweiters abzulesen ist. Benutzt und eingestellt werden folgende Indikatoren (Inhalt jedes Röhrchens 7 cm^3):

	N u m m e r								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I. Reihe: p-Nitrophenol.									
0.1%ige wässrige Lösung von p-Nitrophenol, aufs 10fache mit 0.1 Normalsodalösung verdünnt, cm^3	1.16	0.25	0.4	0.63	0.94	1.4	2.08	3.0	4.05
dazu 0.1 Normalsodalösung . . . „	6.84	6.75	6.6	6.37	6.06	5.6	4.92	4.0	2.95
Bezeichnung der Röhrchen . . . p_h	5.4	5.6	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0
II. Reihe: m-Nitrophenol.									
0.3%ige wässrige Lösung von m-Nitrophenol, aufs 10fache mit 0.1 Normalsodalösung verdünnt, cm^3	0.27	0.43	0.66	1.0	1.5	2.3	3.0	4.2	5.2
dazu 0.1 Normalsodalösung . . . „	6.73	6.57	6.34	6.0	5.5	4.7	4.0	2.8	1.8
Bezeichnung der Röhrchen . . . p	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2	8.4

	N u m m e r								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
III. Reihe: γ -Dinitrophenol. (Stammlösung 0.1 g in 400 cm ³ destillierten Wassers.) 10fach mit 0.1 Normalsodalösung verdünnte Stammlösung des Indicators, cm ³ dazu 0.1 Normalsodalösung „	0.74 6.26	1.1 5.9	1.65 5.35	2.4 4.6	3.4 3.6	4.5 2.5	5.5 1.5	6.6 0.4	— —
Bezeichnung der Röhren . . p _h	4.0	4.2	4.4	4.6	4.8	5.0	5.2	5.4	—
IV. Reihe: α -Dinitrophenol. (Stammlösung 0.2 g in 400 cm ³ destillierten Wassers, Anwendung wie die anderen Indicators.) 10fach mit 0.1 Normalsodalösung verdünnte Stammlösung des Indicators cm ³ 0.1 Normalsodalösung „	0.51 6.49	0.78 6.22	1.2 5.8	1.74 5.26	2.5 4.5	3.4 3.6	4.6 2.4	5.7 1.3	6.7 0.3
Bezeichnung der Röhren . . p _u	2.8	3.0	3.2	3.4	3.6	3.8	4.0	4.2	4.4

Die Reagensgläser sollen möglichst gleiches Kaliber haben, nach der Füllung mit paraffinierten Korken luftdicht verschlossen oder zugeschmolzen und im allgemeinen vor Licht geschützt aufbewahrt werden. Sie sind dann dauernd haltbar.

Zur Untersuchung der Flüssigkeiten (Bouillon, Agar u. s. w.), die fast immer eine Eigenfarbe besitzen, benutzt man den Vergleich nach *Walpole*, ein Holzkästchen mit 6 Bohrungen in der Decke, in welche die Reagensgläser eingestellt werden, und 3 Gucklöchern an der Vorderseite, durch welche man je zwei der hintereinanderstehenden Röhren gegen eine Milchscheibe an der Rückwand des Kästchens sehen und vergleichen kann*. Versuchsanordnung: 2 cm³ der zu prüfenden Bouillon + 4 cm³ Kochsalzlösung (0.85% ig) + 1 cm³ des Indicators stellt man im Reagierröhrchen in eines der vorderen oberen Löcher, in das dahinterliegende ein Reagensglas mit Wasser. In eine Öffnung neben dem ersten Bouillonröhrchen stellt man ein Reagensglas, gefüllt mit 2 cm³ Bouillon und 5 cm³ Kochsalzlösung (zur Farbungsausgleichung); in das hinter diesem liegende Loch dasjenige Indicatorröhrchen aus der Reihe der Standardröhrchen, welches dieselbe Farbtiefe mit dem zu untersuchenden Bouillonröhrchen + Indicator hat. Das Etikett des Standardröhrchens gibt sofort die Wasserstoffionenkonzentration an. Bei trüben Lösungen, z. B. Agar, füllt man nur 1 cm³ der Untersuchungsflüssigkeit ein und 5 cm³ Kochsalzlösung, 1 cm³ von dem Indicator. Das Ergebnis ist das gleiche, die Untersuchung wegen der

* Man braucht gewöhnlich nur 4 Löcher für Röhrchen in der Decke, 2 Gucklöcher an der Vorderseite.

größeren Durchsichtigkeit erleichtert. Schwankende Eiweiß- oder Kochsalzmengen bedingen keinen Untersuchungsfehler. Für geringe Säuregrade ist besonders gut verwendbar γ -Dinitrophenol, für stärkere Säure α -Dinitrophenol. Mit den angegebenen 4 Indicatoren wird eine Konzentrationsbreite p_H von 2·8—8·4 umfaßt. p -Nitrophenol und α -Dinitrophenol sind bei Kahlbaum, Berlin, und Dr. G. Grübler, Leipzig, m -Nitrophenol und γ -Dinitrophenol wie die übrigen bei den Vereinigten Fabriken für Laboratorienbedarf, Berlin N. 39, erhältlich.

Zum Nachweis der Oxydations- und Reduktionswirkungen dienen meist Farbstoffe, welche bei Reduktion entfärbt werden: Küpen, Entstehung von Leukobasen; durch Oxydation „Verküpfung“, d. h. Herstellung der ursprünglichen farbigen Verbindung erfahren. Es handelt sich also um Änderung bestimmter Oxydationsstufen, welche die betreffenden farbigen Verbindungen darstellen (*P. Ehrlich*⁸). Man beobachtet beim Arbeiten mit derartigen Nährmedien, daß Selbstentfärbung eintritt, wenn man sie längere Zeit aufhebt. Schon die Lackmuslösung soll nicht fest, sondern mit einem Wattebausch verschlossen aufbewahrt werden; in der Farbe veränderte wird durch Schütteln, also bei inniger Berührung mit dem Sauerstoff der Luft, wieder brauchbar. Mit Lackmusfarbstoff (Azolithmin), Methylenblau u. s. w. gefärbte flüssige, besonders aber feste Nährböden entfärben sich in den unteren Schichten erheblich schon nach einigen Wochen, u. zw. ist bei etlichen Farbstoffen (besonders Azolithmin) der Luftabschluß dabei das Wesentliche, aber auch Nähragar, -gelatine reduzieren an sich schon. Erhitzung, Licht und Gegenwart von Kohlehydraten, besonders von Traubenzucker, befördern die Reduktion (Entfärbung). Die reduzierende Wirkung gewisser Bakterien tritt sehr viel rascher ein, die Beobachtung dieser Erscheinung ist daher zur Differentialdiagnose wohl verwertbar.

Von Kohlehydraten sind zu differentialdiagnostischen Zwecken eine größere Zahl, von denen die wichtigsten nachstehend aufgeführt sind, geprüft worden. Ihre genauere Kenntnis und Reindarstellung verdanken wir zu einem großen Teil *E. Fischer* und seiner Schule. Ihre planmäßige Anwendung zum Zweck der Isolierung gesuchter Keime aus Gemischen (Gewinnung von Reinkulturen) stammt von *W. v. Drigalski*⁷, die allgemeinere Verwendung unter bewußter Benutzung des bakteriellen Spaltungsvermögens zum weiteren Studium und zur Differentialdiagnose vorliegender Reinkulturen hauptsächlich von *Smith*, *Buchner*, *Petruschky*, um dann in größerem Umfange wieder aufgenommen zu werden vom Verfasser und *H. Conrad*⁹. Gewisse Bakterien wurden früher als „Säurebildner an sich“ betrachtet, z. B. der *Bac. typhi*; sie sind es zum Teil auch. Im allgemeinen liegt indessen die Sache so, daß bestimmte Kohlehydrate in Nährmitteln von gewissen Bakterienarten angegriffen (gespalten) werden, entweder unter Bildung von Gas (meist CO_2) und Säure (meist Milchsäure, Buttersäure, Essig-

säure, Bernsteinsäure), oder von Säure allein, oder aber für die geprüften Arten unangreifbar sind; endlich können in stickstoffhaltigen Nährmedien mit Kohlehydraten zuerst und vorwiegend die Stickstoffkörper (Eiweiße und Eiweißderivate) unter Bildung von alkalischen Substanzen angegriffen werden oder umgekehrt die Kohlehydrate bzw. mehrwertigen Alkohole unter Bildung freier Säure; beide Prozesse gehen vielfach nebeneinander her, doch einer übertönt den anderen. — Es hat sich herausgestellt, daß das Verhalten von Mikroorganismen den Kohlehydraten gegenüber nicht so unabänderlich ist, wie es nach den ersten Versuchen schien; das gilt besonders für die Paratyphus-, die Ruhr- und die Koligruppe. Im allgemeinen läßt sich aber sagen, daß nicht zu alte Bakterienstämme diesen Körpern gegenüber ihre Art-eigentümlichkeit zäh genug festhalten, um differentialdiagnostische Schlüsse zu gestatten. Nicht stets liegt das Verhältnis so einfach, wie oben angegeben: Proteinzersetzung = Alkalibildung, Kohlehydratvergärung = Säurebildung; wie *E. Seitz*⁶ für die Typhusgruppe in Molken nachwies, können statt der Proteine auch Salze bei bakterieller Zersetzung die Quelle der Alkalibildung sein (s. unten Lackmusmolke).

Die Zuckerarten u. s. w. werden nicht immer rein geliefert und sollen aus zuverlässiger Quelle bezogen werden; wir nennen: Merck (Darmstadt), Kahlbaum (Berlin).

*Lockemann*¹⁰ empfiehlt, die Zuckerart vorher durch die Schmelzpunktbestimmung zu prüfen.

In Betracht kommen:

Pentosen: Arabinose (l-Arabinose) $C_5H_{10}O_5$;

Xylose, jener sehr ähnlich, Holzzucker;

Rhamnose (Isodulcit) $C_5H_8O_5(CH_3)$.

Gruppe des Traubenzuckers (Hexosen, Monosaccharide) $C_6H_{12}O_6$:

Dextrose (Traubenzucker, d-Glukose) $C_6H_{12}O_6$
+ H_2O ;

Lävulose (Fruchtzucker, Fructose) $C_6H_{12}O_6$;

Mannose, stereoisomer mit Dextrose;

Galaktose (durch verdünnte Säuren aus Milchzucker gebildet);

Sorbose (Sorbin).

Gruppe des Rohrzuckers $C_{12}H_{22}O_{11}$, Biosen, Disaccharide:

Rohrzucker, Saccharose (Saccharobiose)

$C_{12}H_{22}O_{11}$, durch verdünnte Säuren leicht in Glukosen ($C_6H_{12}O_6$) verwandelt und daher nicht gern für die vorliegenden Zwecke verwendet;

Milchzucker, Lactose* (Lactobiose), $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$;
Maltose, Malzzucker;

desgleichen Triose: Raffinose $C_{18}H_{32}O_{16} + 5H_2O$.

Cellulosegruppe (Polysaccharide):

Amylum solubile ($C_6H_{10}O_5$), aus Stärke durch Kochen mit verdünnter Kalilauge entstehend;

Dextrin, Stärkegummi, aus Stärke durch Erhitzen entstehend;

Inulin, stärkeähnlich, geht durch Kochen mit Wasser in D-Fructose über;

Glykogen, in Leber und Muskelfleisch enthalten, wird durch Kochen mit verdünnten Säuren oder durch gewisse Enzyme in Traubenzucker, durch andere in Maltose verwandelt.

Mehrwertige Alkohole: Glycerin $C_3H_5(OH)_3$,

Erythrit $C_4H_6(OH)_4$,

Adonit $C_5H_7(OH)_5$,

Mannit $C_6H_8(OH)_6$,

Dulcit, stereoisomer mit Mannit,

Sorbit, desgleichen,

Inosit, isomer zu den Hexosen
($CH(OH)_6$).

Glykoside (Synthesen von Alkoholen und Zuckern):

Arbutin $C_{12}H_{16}O_7$;

Salicin $C_{13}H_{18}O_7$, werden durch Alkalien, Säuren oder Enzyme derart gespalten, daß eine Glukose (meist Traubenzucker) und ein Alkohol, Aldehyd u. s. w. gebildet wird.

I. Die Herstellung der einzelnen differentialdiagnostischen Nährmittel.

Halbierte Kartoffeln nach R. Koch¹³:

Große Kartoffeln (Salatkartoffeln) mit möglichst wenig Fehlern und Keimen („Augen“) mit der Kartoffelbürste im Wasser sauber bürsten und waschen, Schale schonen; „Augen“ mit der anhaftenden, sehr hitzebeständige Sporen enthaltenden Erde mit dem Messer ausstechen; $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde in Sublimatlösung 1:1000 legen, gründlich unter der Leitung oder in häufig gewechseltem Wasser abspülen, dann $\frac{3}{4}$ Stunde in strömendem Dampf halten (Dampftopf). Inzwischen die „feuchte Kammer“ herrichten: hohe Doppelschalen von etwa 20—22 cm Durch-

* Ältere Lehrbücher¹¹ führen als „Lactose“ eine durch Kochen aus Milchzucker mit verdünnten Säuren entstehende Hexose $C_6H_{12}O_6$ auf, die sich wie Dextrose verhält, aber nicht gärunsfähig ist. Heute wird unter Lactose stets Milchzucker verstanden¹².

messer mit 1%iger Sublimatlösung auswischen*, den Boden mit einem passenden runden sublimatgetränkten Fließpapier belegen, das feucht, aber nicht tropfnaß sein soll.

Die noch heiße Kartoffel mit desinfizierten Fingern fassen, mit ausgeglühtem noch heißem Messer halbieren, sofort in die Schalen legen, auseinanderklappen, Schnittebene nach oben legen. Die Finger sollen den Schnitttrand nicht berühren, damit nicht etwa Desinfektionsflüssigkeit auf die Schnittfläche gelangt, die Kulturfläche werden soll. Ein Gehilfe hält zweckmäßig die Deckelschale darüber, um Luftkeime abzuhalten. Sprechen über offenen Nährböden vermeiden (Tröpfcheninfektion!).

Die „Kontrollkultur“, z. B. bei Prüfung auf Typhus eine Typhusreinkultur, wird auf der zweiten Hälfte derselben Kartoffel angelegt, da jede Knolle hinsichtlich ihres Stärke-, Säure- u. s. w. Gehalts von der anderen verschieden sein kann.

Kartoffelscheiben nach E. v. Esmarch^{14, 15} in Doppelschälchen von 4—5 cm Durchmesser.

Vorbereitung der Kartoffeln wie vorher durch Waschen in Wasser, Bürsten, Ausschneiden der „Augen“, aber keine Anwendung von Sublimat. Die gereinigten Kartoffeln werden mit ausgeglühtem, heißen Messer in 0.5—1 cm dicke Scheiben geschnitten, diese der Form der Schälchen angepaßt in die Doppelschälchen gelegt und für $\frac{3}{4}$ Stunden in strömenden Dampf gebracht.

Für Kontroll- oder „Parallelkulturen“ die mit Scheiben derselben Kartoffel beschickten Schälchen bezeichnen!

Kartoffelstückchen im Reagensglas:

Große Kartoffeln reinigen wie vorher, ohne Sublimatanwendung, schälen, gründlich unter der Wasserleitung abspülen, mit dem „Kartoffelbohrer“ (einem metallenen Hohlzylinder mit geschärftem Rand) Zylinder von etwa 4 cm Länge ausstechen, diese diagonal durchschneiden mit ausgeglühtem Messer, abwaschen unter fließendem Wasser und in vorbereitete sterile Reagensgläser bringen, welche auf dem Grunde etwa 1 cm³ sterilen Wassers (oder 0.9% NaCl-Lösung) enthalten.

Der Kartoffelkeil, mit dem breiten Ende nach unten in das Reagensglas gebracht, soll nicht in der Flüssigkeit stehen; daher verwendet Roux Gläser, die über dem Boden eine Einkerbung besitzen, auf der das Kartoffelstückchen aufsitzt, Günther einfache gewöhnliche Reagensgläser, auf deren Boden er ein etwa 1 cm langes Glasstückchen stellt.

Wachstum auf Kartoffel: B. coli grauer, gelblicher bis brauner Rasen; B. typhi farbloser, kaum sichtbarer Rasen; Paratyphus A wie B. typhi; Paratyphus B und B. enteridis-Gruppe: graugelb; B. faec. alcaligenes: graugelb; Ruhrgruppe: kaum sichtbarer Rasen; B. mallei: bernstein- oder honigfarbener Belag, dann braunrot; Keuchhustenbacillen: schleimig, glänzend, bräunlich.

Glycerinkartoffel in Keilform: „Kartoffelkeile“ wie oben beschrieben herstellen, gut in fließendem Wasser abwaschen, dann in einer Mischung von 95 Teilen sterilen Wassers und 5 Teilen Glycerin einige Stunden einweichen; in sterile Reagensgläser je etwa 1.5—2 cm³ 5% igen

* Sterilisierung solcher Schalen in trockener Hitze ergibt zu viel Bruch.

sterilen Glycerinwassers füllen, die eingeweichten Kartoffelkeile in die Gläser einstellen, so daß sie mit dem stumpfen unteren Rande in die Flüssigkeit eintauchen. 45 Minuten in strömendem Dampf sterilisieren.

Alkalische Glycerinkartoffel nach *Anzilotti*¹⁶: Gut gewaschene Kartoffelkeile werden in 6%iger Glycerinlösung, welche mit gesättigter Sodalösung zu alkalischer Reaktion gebracht ist, ungefähr 20 Minuten lang gekocht. Die Kartoffel soll ganz weich und gequollen sein und alkalisch reagieren; reagiert das Glycerinwasser sauer, so wird mit Natronlauge die alkalische Reaktion wieder hergestellt. Inzwischen werden sterile Reagensgläser mit Einkerbung nach *Roux* oder mit 1 cm langen sterilen Glasstäbchen beschickte (s. oben) mit etwa 1·5—2 cm³ einer sterilen 6%igen Glycerinbouillon versehen und in sie die Kartoffelkeile eingestellt. Sterilisierung bei 120° im Autoklaven 20 Minuten lang.

Kartoffelkeile werden, mit 2—3%iger steriler Kochsalz- oder $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ %iger steriler Sodalösung übergossen, 45 Minuten im Dampf sterilisiert, für Cholerazüchtung benutzt (*O. Voges*¹⁷). Das Wachstum des Cholera bacillus erfolgt schon bei 20°, Farbe bräunlich-grau bis braun.

Als Ersatz für Kartoffel hat *P. G. Heinemann*¹⁸ folgenden konstant zusammengesetzten Nährboden angegeben: In 600 cm³ Wasser werden 10 g Agar-Agar gelöst, inzwischen eine Auflösung folgender Salze hergestellt in 200 cm³ Wasser: Kaliumbiphosphat 2 g, Natriumbiphosphat 2 g, Magnesiumsulfat 2 g, Calciumchlorid 2 g, Ammoniumlactat 2 g, Asparagin 2 g.

Diese Lösung dem heißen Agar zusetzen und in dem ganzen 10 g Pepton. sicc. lösen. Die saure Reaktion alsdann auf den Phenolphthalein-Neutralpunkt einstellen, filtrieren. Zu diesem heißen Filtrat setzt man 30 g Stärke, welche vorher in Wasser ausgewaschen und im Mörser völlig homogen zerrieben wurde, unter Umrühren allmählich zu. Erhitzen fast bis zum Sieden, Gewicht 1000 g. Sterilisieren im Autoklaven bis 120° fünf Minuten lang.

Ammon-Traubenzuckeragar soll nach *B. Kisch*⁵⁰ die Eigenschaft haben, nur bestimmte in bezug auf Stickstoffquellen anspruchslöse Arten aufkommen zu lassen und dadurch im besonderen Fall Paratyphus A und Paratyphus B zu differenzieren. Vorschrift: 0·1% K₂HPO₄, 0·05% MgSO₄, 0·02% NaCl, eine Spur FeSO₄ und Calciumphosphat und 1% Traubenzucker in Aq. destill. lösen, das Ganze mit Natriumbicarbonat auf alkalische Reaktion gegen Lackmus bringen, 2% Agar (vorher gelöst in Wasser) zufügen; nach Sterilisierung in kleine Schälchen gießen, die zur Anlage verschiedener Strichkulturen in Felder eingeteilt werden (mit dem Fettstift außen bezeichnet). Paratyphus A wächst nie, Paratyphus B stets nach 48 Stunden.

Stark alkalischer Traubenzuckeragar in hoher Schicht⁵¹: Verflüssigten Nähragar von 1% Agargehalt mit 1·5% Traubenzucker und 100 cm³ steriler Normalsodalösung über den Phenolphthaleinneutralpunkt auf den Liter berechnet versetzen. Abfüllen in sterile Reagensgläser in hoher Schicht, etwa 20 Minuten sterilisieren, erstarren lassen.

Echte Diphtheriebacillen sollen nur oder vorzugsweise unten wachsen (anaerob). Pseudodiphtherie- und Xerosebacillen nur ganz oben oder überhaupt nicht.

Derselbe mit anderem Alkaligehalt⁵²: Agar 10 g, Pepton sicc. 10 g, Fleischextrakt 10 g, Kochsalz 5 g, Wasser 1000 cm³ gekocht bis zur Lösung, mit Sodalösung bis zum Lackmusneutralpunkt neutralisieren, 15 g Traubenzucker zusetzen sowie 125 cm³ Normalsoda-

lösung, nochmals $\frac{1}{2}$ Stunde kochen. In sehr hoher Schicht in schmalen Reagensgläsern erstarren lassen.

Unterscheidung wie vorher. Wird als praktisch gut brauchbare Unterscheidungsmethode angegeben, obwohl Diphtheriebacillen sonst gar keine Anaerobier sind.

Optochin-Ascites-Bouillon nach G. Nachmann: Zu 100 cm^3 einer Ascitesbouillon (Nährbouillon 2 Teile — Ascites 1 Teil) wird 0.1 cm^3 einer 1%igen wässerigen sterilen Optochinlösung gefügt. Abfüllen in Reagensgläser.

Zur Prüfung auf Pneumokokken von Morgenroth¹⁹ empfohlen: Streptokokken (longus und viridans) wachsen, Pneumokokken und Str. mucosus werden gehemmt.

Gallebouillon: Rinder-, Menschen- oder Kaninchengalle wird durch $\frac{1}{2}$ stündiges Kochen in Reagensgläsern im Wasserbade sterilisiert; davon 0.1 cm^3 zu 1—2 cm^3 Nährbouillon, durch Schütteln innig mischen.

In dieser Mischung werden eingetragene Pneumokokken und Str. mucosus fast stets aufgelöst und wachsen nicht, andere Streptokokken bleiben erhalten und wachsen (F. Neufeld²⁰).

Hier mag auch erwähnt werden die

Lösung von Wölfel für die Feststellung von Indolbildnern: Pepton. sicci 20.0, Kochsalz 0.5, Kaliumnitrat 0.0075, Natriumcarbonat 0.2, Aq. destill. 100.0. Abfüllen in Reagensgläser. Die Kulturen werden 24 Stunden bei 37° gehalten. Bei Zusatz einiger Tropfen von Schwefelsäure tritt bei Indolbildnern die Nitrosoindolreaktion auf: Rotfärbung, der Farbenton kann bläulich bis violett ausfallen.

Gleichem Zweck dient die **Lösung** von H. Zipfel²¹: Tryptophan 0.3, Ammoniumlactat 5.0, Kaliumphosphat (sekundär) 5.0, Magnesiumphosphat 0.3, Aq. destill. 100.0.

II. Nährmedien mit Verwendung von Blut oder Milch.

Die Veränderung des Blutes infolge von Abbau durch Bakterienenzyme kann darin bestehen, daß in der Farbe unverändertes Hämoglobin bei erhaltenem Stroma aus den Blutkörperchen austritt, das Blut wird lackfarben: Hämolyse; daß bei erhaltenem Stroma Hämoglobin abgebaut wird: Hämoglobinopepsie; oder endlich Hämoglobin und Stroma abgebaut werden: Hämopepsie²². In den beiden letzten Fällen wird Veränderung der Farbe (Grün-, Gelbfärbung u. s. w.) die Hämoglobinveränderung anzeigen.

Blutagar nach R. Pfeiffer, vorwiegend für Nachweiszwecke gebraucht, s. S. 615.

Blutagar nach H. Schottmüller²³: Nähragar (schwach alkalisch), 5 Teile, wird verflüssigt und auf 45° abgekühlt; Zusatz von 2 Teilen steril entnommenen Menschenblutes, durch Schütteln oder Umrühren mit sterilem Glasstabe gut mischen, in Reagensgläser abfüllen und schräg legen oder in Petrischalen bzw. zu sparsamerer Verwendung in kleinen Doppelschälchen von etwa 4 cm Durchmesser zu Platten ausgießen. Niederschlagwasser verdunsten lassen. Prüfung auf Sterilität einen Tag im Brutschrank. Der Agar darf nicht zu trocken werden.

Statt Menschenblut für viele Zwecke auch Tauben-, Meer-schweinchen-, Kaninchen-, Hammel-, Rinderblut gut verwendbar. Einem besseren Wachstum von Kokkenarten dient ein Zusatz von 1% Traubenzucker.

Blutagar nach *Thalmann*: Zu je 5—10 cm³ verflüssigten schwach alkalischen Nähragars, der auf 45° abgekühlt ist, werden je fünf Tropfen Menschenblut gesetzt, Mischung durch Schütteln (Schaumentstehung auf der Oberfläche möglichst vermeiden!).

Blutbouillon: Steril entnommenes Blut wird schwach alkalischer Nährbouillon zugesetzt; die Lösung soll tiefrot gefärbt sein; es genügen auf etwa 8 cm³ Bouillon 5 Tropfen Blutes.

Blutkörperchenbouillon: Gewaschene Blutkörperchen (von Kaninchen, Ziegen, Menschen) werden der Nährbouillon bis zur Entstehung dunkelroter Färbung zugesetzt.

Glycerin-Blutagar nach *Mandelbaum* und *Heinemann*²⁵: Auf der Oberfläche von 5% Glycerin-Nähragar (in Röhrchen oder Platten) werden einige Tropfen steril entnommenen Menschenblutes (aus der Fingerbeere) mit der ausgeglühten Platinöse oder dem abgerundeten Ende eines sterilen Glasstabes gleichmäßig ausgestrichen. Impfung nur an den blutbestrichenen Stellen. Platte 24 Stunden im Brutschrank prüfen.

*Nieter*²⁶ mischt 6%iges Glycerinagar, 5 Teile, mit 2 Teilen defibrinierten Menschen-, Kaninchen- oder Hammelblutes.

Diese Nährmedien enthalten Hämoglobin im Stroma der Blutkörperchen. Der undurchsichtige Nährboden wird (in dünner Schicht) aufgehellt, die dunkle Blutdeckfarbe wird zur roten Lackfarbe: Hämolyse; oder der Farbstoff wird verändert und man beobachtet Verfärbung ins Schwärzliche, Grüne, Gelbe u. s. w.

Die wichtigsten Veränderungen von Blut durch Bakterien:

Streptokokkengruppe: *Str. erysipelatos* s. *pyogenes longus*: Hämolyse (glasheller Hof); der übrige Blutfarbstoff wird schmutzigbraunrot. *Str. viridans* s. *mitior* (*Schottmüller*²⁷) bildet grüne Kolonien nach 2—4 Tagen; *Str. mucosus*: grüngrau, saftig-schleimig, Hämolyse nicht deutlich; *Pneumokokken* grün, dunkelgrün oder grünschwarz wie *Str. virid.* ohne Hämolyse. *Str. equi* (Druseerreger) starke Haemolyse mit Aufhellung der ganzen Platte, der noch nicht ausgelaugte Blutfarbstoff wird nicht dunkel verfärbt²⁸.

Meningokokken verändern *Löfflersches* Traubenzucker-Bouillon-Serum mit Blutzusatz nicht (Gegensatz zu *Pneumokokken*).

Staphylococcus pyogenes aureus: Pathogene Stämme bedingen angeblich Hämolyse (wie bei *Streptokokken* nicht ganz konstant!). *Micrococcus melitensis*: Hämolyse deutlich. *Diphtherie*: Hämolyse fraglich. Schmäler brauner Hof um weißgefärbte Kolonien auf Glycerin-Blutagar²⁷; *Pseudodiphtherie*- und *Xerosebacillen*: rotgestrichelte Kolonien mit oder ohne braungelben Hof²⁵.

Influenzabacillen: keine Hämolyse; **Keuchhustenbacillen**: Aufhellung. Hämolyse.

Cholera: Hämolyse fehlt meist; **Vibrio „El Tor“**: Hämolyse deutlich.

Typhus-, Paratyphus-, Kolibacillen: schwärzliche Verfärbung des Hämoglobins; **Metatyphus**: keine deutliche Veränderung²⁶.

Milchagar: Milch und schwach alkalischer Nähragar wird zu gleichen Teilen gemischt. Ausgießen in dünner Schicht in Reagensgläser zu Schrägkulturen oder in Platten. Peptonisierende Bakterien bewirken Aufhellung. Ähnlichen Zwecken dient die Beobachtung in einfacher *Nährgelatine*.

Thymogelatine nach *Fermi*²⁹: 3% Thymol zu 5—10%iger wässriger Gelatinelösung.

III. Beobachtung von Oxydations- oder Reduktionswirkungen.

Neutralrotagar nach *Rothberger*³⁰: Herstellung einer sterilen wässrigen gesättigten Lösung von Neutralrot (Toluolenrot). Hiervon mit steriler Pipette in Röhrchen mit verflüssigtem schwach alkalischen Nähragar je 2—3 Tropfen einbringen, mischen, auf etwa 45° abkühlen lassen. Die zu untersuchenden Bakterienreinkulturen werden als Bouillonkulturen oder Aufschwemmungen in solcher verwendet. Über 0.5 cm³ der Kultur wird der gefärbte Agar ausgegossen, vorsichtig durch Hin- und Herneigen gemischt, rasch abgekühlt und zur Erstarrung gebracht. Dann bebrüten. Modifikationen von *W. Scheffeler*³¹:

Neutralrot-Glycerinagar: Mit 100 cm³ verflüssigten Glycerinagars wird 1.5 cm³ konzentrierte wässrige Neutralrotlösung vermischt; abfüllen in Reagensgläser in hoher Schicht; Anlegung von Stichkulturen (seitlich, nahe der Wandung).

Neutralrot-Traubenzuckeragar (am häufigsten gebraucht): 100 cm³ Nähragar verflüssigt, dazu Traubenzucker 0.3 cm³, Neutralrotlösung (gesättigte, wässrige) 1 cm³; abfüllen wie vorher, 1½ Stunde im Dampf sterilisieren. Anlage von Stichkulturen. Eine empfehlenswerte Abänderung ist die

Weiche Agargallerte von *A. Oldekop*³²: Schwach alkalischer Nährbouillon (in 500 cm³ Aqua dest. 5 g Fleischextrakt Liebig, 2.5 g Kochsalz und 10 g Pepton. sicc. Witte lösen, mit Sodalösung schwach alkalisch machen, Prüfung mit Lackmuspapier, eine Stunde kochen, filtrieren, Reaktion nachprüfen und nötigenfalls wieder alkalisch herstellen) wird Stangenagar in Menge von 0.3% (bis 0.5%) gut zerkleinert zugesetzt, durch einstündiges Kochen im Dampftopf gelöst. Filtrieren: dem Filtrat 1% einer gesättigten wässrigen Neutralrotlösung und 0.15% Traubenzucker zusetzen, nach Mischung und Lösung in Mengen zu je 5 cm³ in Reagensgläser abfüllen (besser in hoher Schicht zu je 10 cm³, Verfasser), im Dampftopf 1—1½ Stunden (besser nur ½ Stunde! Verfasser) sterilisieren. Alsdann in kaltem Wasser rasch erstarren lassen.

Fluorescenz oder Entfärbung tritt schon nach 12 Stunden ein. Arbeitet sparsam und rasch!

Neutralrotgelatine von *O. Heller*³³:

Im Reagensglas werden 10 cm³ schwach alkalische Nährgelatine verflüssigt, 4 Tropfen einer angewärmten gesättigten Neutralrotlösung und 0.5 cm³ der zu prüfenden 24stündigen Bouillonkultur zugefügt; schütteln, bei 37° halten.

Eventueller Zusatz von 1% Traubenzucker. Reaktion angeblich schon nach 6 Stunden. Bietet keine besonderen Vorteile dem *Oldekopschen* Agar gegenüber (Verf.).

Änderungen der Reaktion: Für den *Oldekopschen* Neutralrotagar hat *W. Rosenthal*³⁴ Alkalisierung bis zum Phenolphthaleinpunkt, *A. Corsini*³⁵ völlig neutrale Reaktion empfohlen.

Löfflersches Traubenzucker-Bouillon-Serum mit Zusatz von **Neutralrot** im Verhältnis 1:10.000, in Röhren schräg erstarrt, zur Unterscheidung von Meningokokken (*Weichselbaum*) von *R. W. Buchanan*³⁶ verwendet. Nach Bebrütung Auftreten von Fluoreszenz.

Neutralrot wird nicht verändert durch *B. typhi* Koch-Eberth, *B. faecal. alcalig.* die Bakterien der Ruhrgruppe, *B. supestifer* Voldagsen, *B. pseudotuberculosis* rodentium. Fluoreszenz und Verfärbung bedingen: *B. coli*, die Gruppe der *B. enteritidis*, Paratyphus B, Paratyphus A (geringer), *Micrococcus melitensis* Bruce, Meningokokken.

Agar nach Oldekop mit Malachitgrün (*Buchholz*⁴⁵): Der weiche 0.3 bis 0.5%ige *Oldekopsche* Agar wird statt mit Neutralrot mit einem Zusatz von 4% gesättigter Malachitgrünlösung 120 Höchst versehen. Reichliche Beimpfung durch Stich mit breiter Öse.

Paratyphus B entfärbt schon nach 16–20 Stunden (hellgelbe Färbung des Nährbodens), desgleichen Mäusetyphus und *B. enteritidis* Gärtner; keine wesentliche Veränderung durch Paratyphus A, Typhus und *B. coli* am 1. Tage, langsamere am 2. Tage.

Dasselbe mit einem Orceinzusatz statt Neutralrot u. s. w., u. zw. von 5% einer mit 50% Alkohol hergestellten gesättigten Orceinlösung.

Typhus, Paratyphus B, Mäusetyphus und *B. enteritidis* entfärben nach 10–20 Stunden bis auf einen schmalen Ring an der Berührungsstelle mit der Luft; Paratyphus A, *Bact. coli* und Ruhr machen keine Entfärbung in den ersten Tagen.

Ähnliche Wirkungen sieht man bei Zusatz von 15% Lackmus zu dem weichen Agar. Entfärbung durch *B. typhi*, Paratyphi B, *coli*, enteritidis und Mäusetyphus schon nach 10 Stunden.

Präparate: Orcein von Grüber (Leipzig), Lackmus in Substanz von Kahlbaum (Berlin). Malachitgrün 120 Höchst; die gesättigten Farblösungen sind filtriert dem heißflüssigen fertigen Agar zuzusetzen, nicht zu lange zu kochen! Orceinagar ist mehrfach zu filtrieren. Nährböden im Dunklen aufheben.

Methylenblau-Nähragar (*Fr. Müller*): Vorsicht beim Zusatz des antibakteriell wirkenden Farbstoffes nötig! Zu 100 cm³ schwach alkalischem Nähragar, verflüssigt, wird 1 cm³ einer sterilen wässrigen frisch bereiteten Methylenblaulösung 1:1000 gesetzt; abfüllen in Mengen von je etwa 8 cm³ in Reagensgläser, kurz aufkochen, rasch erstarren lassen. Stichkultur. Bei Bereitung kleiner Mengen auf 100 cm³ Nähragar 1 bis höchstens 2 Tropfen einer 1%igen Blaulösung.

Lackmusagar mit Zusatz von etwa 1.5% Lackmustinktur zu Nähragar wird ähnlich verwendet³⁷. Nur frisch bereitet brauchbar!

Wirkungen: *B. typhi* reduziert Methylenblau, dagegen nicht Lackmusfarbstoff, *B. Coli* reduziert Lackmus vollständig (Literatur *Fr. Müller*³⁷).

Rosolsäurenährböden³⁸: Zu je 10 cm^3 schwach alkalischen Nähragars werden zugesetzt Rosolsäure 0.0068; desgleichen zu Nährgelatine 0.0045 (wenig brauchbar) und zu Nährbouillon 0.003. Bei Reduktion Bildung von „Leukorosolsäure“.

Es entfärben (reduzieren) u. a.: Cholera, V. Finkler-Prior, V. Metschnikoff, Typhus, Milchsäurebacillen.

Indigosulfonsaures Natrium wird in Mengen von 0.1 % dem Nähragar zugesetzt: durch reduzierende Bakterien wird der blaue Nährboden entfärbt.

Naphtholagar zum Nachweis der Reduktion³⁹: Man bereitet zwei Lösungen: 1. 1 g α -Naphthol wird mit 100 cm^3 Wasser gekocht, dabei geht das Naphthol zum Teil in Lösung; während des Kochens Zusatz soviel konzentrierter Natronlauge, bis die über dem teilweise wieder ausgefallenen Naphthol stehende Lösung nicht mehr getrübt ist, sondern einen klaren bräunlichen Farbenton angenommen hat.

2. 1 g p-Nitrosodimethylanilin wird in 100 cm^3 Aqua dest. gelöst. Lösung 1 und 2 werden zu gleichen Teilen gemischt, filtriert und mit $\frac{2}{3}$ Volumen schwach alkalischen verflüssigten Nähragars versetzt. Ausgießen in Petrischalen, Anlage von Oberflächenausstrichen.

Blaue bis blaugrüne Farbstoffbildung zeigt Reduktion an und erfolgt durch Staphylococcus pyog. aur. nach 1 Minute, B. pyocyaneus nach 5 Minuten, Hefe nach 10 Minuten.

Naphtholagar zum Nachweis der Oxydation³⁹:

Lösung 1: wie oben mit α -Naphthol zubereitet. Lösung 2: 1 % ige wässrige Lösung von Dimethyl-p-phenylendiamin.

Von beiden Lösungen werden gleiche Teile gemischt, diese Mischung zu 3 Teilen verflüssigten, schwach alkalischen Nähragars gesetzt, gemischt, in Petrischalen ausgegossen. Nährboden soll stets frisch bereitet werden! Oberflächenausstrich.

Oxydation durch Bildung blauen Farbstoffes angezeigt bei B. pyocyaneus (schon nach 10 Sekunden), B. anthracis, B. subtilis, V. cholerae. Keine Oxydation durch Staph. aureus, B. dysenteriae, B. typhi inkonstant!

Selen- und Telluragar⁴⁰: Natrium selenosum in 2 % iger wässriger Lösung wird sterilisiert und in Menge von 4—10 Tropfen dem verflüssigten Nähragar zugesetzt. Zusatz von Natrium tellurosium gleichfalls angewendet, doch ist hier die Wachstumshemmung stärker ausgeprägt.

Diese Nährböden besonders zur Prüfung der Anaerobier benutzt. Die Bakterien reduzieren das Salz zu metallischem Selen u. s. w. und erzeugen dadurch Rotfärbung.

Die Bildung von Säure oder Alkali zeigt ohne besonderen Zusatz von Kohlehydraten an Jequirity-Infus (P. Kaufmann): 10 g Jequirity-Samen (vom Abrus precatorius) werden durch Zerstampfen im Mörser entschält, die Samen (8 g übrig bleibend) mit 100 cm^3 Wasser 2 Stunden im Dampftopf gekocht, dann kalt filtriert und in Reagensgläser abgefüllt, sterilisiert. Die Farbe der neutralen Lösung ist hellgelb.

Sie wird durch *B. typhi* alkalisch gemacht (Grünfärbung), durch *B. coli* sauer (Entfärbung).

Bouillon oder Nähragar mit Phenolphthalein nach *R. Ziellecky*⁴¹: Verwendet werden eine Stammlösung von Phenolphthalein 0·5 g in 100 cm³ Wasser, schwach alkalische Nährbouillon oder Nähragar. Zur Herstellung des Nährbodens wird eine frische 20fache Verdünnung der Phenolphthalein-Stammlösung (1 cm³ zu 20 cm³ sterilen Wassers) hinzugesetzt in folgenden Mengen: zu 5 cm³ alkalischer Nährbouillon 0·1 bis 0·5 cm³, zu 5 cm³ alkalischen Nähragars 1 cm³; ½ Stunde im Dampftopf sterilisieren.

B. coli entfärbt Bouillon nach 5—8 Stunden, Agar nach 8—9 Stunden, *B. typhi* entfärbt erst nach ungefähr 15 Stunden.

Abänderung des vorigen nach Omeliansky⁴²: Schwach alkalisches Nähragar wird mit Zusatz von 0·5% ameisensaurem Natron und Phenolphthalein wie oben zubereitet; schräg legen in Reagensgläsern, Oberflächenausstrich mit der Platinöse über der ganzen Oberfläche mit Impfung des Kondenswassers, Bebrütung.

B. coli nach 3—4 Stunden Gärung des Kondenswassers, nach 5—8 Stunden Färbung zunächst im oberen Teil des Agars; *B. typhi*: keine Gärung, Rosafärbung nach 2—3 Tagen; Diphtherie: schwache Entwicklung, keine Färbung; Pseudodiphtherie: üppig, gelblich, am 2. bis 3. Tag schwache Färbung, keine Gärung.

Methylorange-Bouillon verwendet *Frégonneau*⁴⁰: 0·5—1 cm³ einer Methylorangelösung von 1/1000 auf 8—10 cm³ Bouillon.

Den Farbstoff „zerstören“ Typhus, Paratyphus, Proteus, *B. coli*. Hinzufügung eines Tropfens von Methylenblau med. Höchst außerdem: Paratyphus B reduziert, entfärbt.

Frégonneau läßt unentschieden, ob die Methylorangeveränderung auf Reduktion beruhe. Einen methodischen Ausbau hat seine Untersuchung nicht erfahren.

A. Mankowski versetzt Nähragar mit seinem Reagens, sterilisiert, und legt Schrägkulturen an, um Reduktion zu beobachten. Das Agar sei blauviolett. Man kann auch erst züchten und dann durch Zusatz des Reagens auf die Agaroberfläche sofort die Reaktion erhalten.

Typhus karmoisin- (himbeer-) rot, *B. coli* blaugrün, später farblos.

Reagens: a) 1%ige Kalilauge mit Säurefuchsin gesättigt, bis zur schwarzblauen Färbung, b) wässrige gesättigte Indigocarminlösung; davon mischen 2 Teile a mit 1 Teil b und 22 Teilen Aqua dest., es entsteht eine dunkelblaue Flüssigkeit.

IV. Nährmedien mit Zusatz von Kohlehydraten

(Zuckerarten und mehrwertigen Alkoholen, zur Prüfung des Spaltungsvermögens der Mikroorganismen):

Die Zusatzmenge der Kohlehydrate und festen mehrwertigen Alkohole beträgt bei flüssigen Nährböden 0·5% oder wenig mehr, bei

gelatinierenden (festen) durchschnittlich etwa 1%. Glycerin wird in einem Verhältnis von 5—6% zugesetzt. Ein Teil der Kohlehydrate ist durch Kochen in den zur Verwendung kommenden Lösungen leicht zersetzlich; deshalb wird grundsätzlich die Kohlehydratlösung nicht über die notwendige Zeit hinaus erhitzt.

Als Indicator wird Lackmusfarbstoff, am häufigsten in Form der Lackmuslösung nach *Kubel* und *Tiemann* von *Kahlbaum*, Berlin, verwendet oder Azolithmin in 1% iger Lösung. Das *Kahlbaumsche* Präparat ist alkoholhältig, steril und wird mit dem betreffenden in ihm gelösten Kohlehydrat (z. B. Milchzucker) vor Zusatz zu dem betreffenden Nährmedium für sich kurze Zeit — etwa 15—20 Minuten — erhitzt, der Alkohol dabei verjagt. Stets wird die betreffende Nährlösung (Bouillon, Nährgelatine, Agar, Serum, Ascites) für sich bereitet und erst den möglichst weit fertiggestellten Nährmitteln das Kohlehydrat zugesetzt. Orcein, Methylorange, Rosolsäure bieten im allgemeinen dem Lackmusfarbstoff gegenüber keinen Vorteil. Fuchsin wirkt zuweilen hemmend, hat aber nach *W. Stern*⁴³ (s. auch unten S. 711) einen Vorzug insofern, als es in Bouillon nicht nur auf die sauren, sondern auch auf die aldehydartigen Spaltungsprodukte reagiert, die Kohlehydratspaltung also vollkommener als Lackmus anzeigt. Zum Teil zeigen die Indicatoren nicht nur Säure- oder Alkalibildung, sondern durch Veränderung ihres Körpers unmittelbar auch Oxydations- bzw. Reduktionswirkung (s. oben III.). Lackmuslösung wird Flüssigkeiten (Bouillon) meist in Mengen von 4 bis 5%, festen Nährböden in Mengen von 10—15% zugesetzt.

Einzelne Herstellungsvorschriften.

Traubenzuckeragar u. s. w. mit Neutralrotzusatz s. oben unter III. Andere Nährböden mit Traubenzucker (Dextrose, d-Glukose):

*Beijerincks Kreidenährböden*⁴, angegeben als „Verfahren zum Nachweis der Säureabsonderung bei Mikroben“:

Eine erstarrungsfähige, für Säureerzeugung geeignete Nährmasse vermischt man mit feiner Schlemmkreide, gießt die gut gekochte Masse in sterile Glasschalen. Auf dem milchweißen Nährboden erzeugt jeder Tropfen Säure und ebenso eine säurebildende Kultur eine helle Stelle durch Zersetzung der Kreide. Beispiel (zum Nachweis von Milchsäurebakterien und Essigsäureferment in gärender Maische):

20 g Hefe in 100 cm³ Leitungswasser kochen, 8 g Gelatine oder $\frac{3}{4}$ g Agar-Agar und 5—10 g Traubenzucker hinzusetzen, kochen bis zur Lösung, filtrieren, hierzu einige Tropfen einer wässrigen sterilen Aufschwemmung von Schlemmkreide bis zur völligen Trübung fügen. Plattengießen in kleinen Glasschalen. Reaktion empfindlich, auch Bernsteinsäure wird nachgewiesen. Der Nachweis der jeweiligen Säure und eventuell eines bekannten säurebildenden Mikroorganismus soll möglich werden durch Auswahl anderer Carbonate — Magnesium-, Barium-, Strontium-, Mangan-, Zink- — u. s. w. Carbonats. Eine genaue Ausbildung hat diese Methode nicht erfahren.

Bouillon nach *J. Bronstein* und *G. N. Grünblatt*⁴⁸: Bereitet werden Fleischwasser-Peptonbouillon mit einem Gehalt von $\frac{1}{2}\%$ Traubenzucker; Reagens nach *Mankowski* (s. oben S. 707 und ⁴⁷): 1. 2 g Indigocarmin in 100 cm³ Aqua dest. gelöst; 2. 10 g Säurefuchsin (*Grübler*) in 100 cm³ reiner 1%iger Kalilauge. Vor dem Gebrauch 2 Teile der Lösung 1 mit 1 Teil der Lösung 2 und 22 Teilen Aqua dest. mischen; damit die Traubenzuckerbouillon bei 37° auf Neutralpunkt einstellen (so daß keine Farbenänderung erfolgt), zu je 5 cm³ in sterile Reagensgläser abfüllen, etwa 15 Minuten sterilisieren, diese frisch bereitete Bouillon mit den zu prüfenden Kulturen beimpfen und 24 Stunden mit unbeimpften Kontrollen im Brutschrank halten. Darauf in jedes Glas 3 Tropfen des o. a. *Mankowskischen* Reagens bringen. Bei längerem Stehen wird die Lösung durch Anziehen von CO₂ wieder sauer.

Sterile Bouillon wird sofort schön blau; Diphtheriebacillen rubinrot, Pseudodiphtheriebacillen dagegen grün nach einigen Minuten, nach 12 Stunden ebenfalls rot.

Traubenzuckeragar mit Harnsäure als Indicator (*Berghaus*⁴⁹): Es werden verwendet schwach alkalisches Nähragar (2% Agar) mit 1% Traubenzucker; eine Lösung von saurem harnsauren Lithium: in 100 cm³ Wasser 0.73 g Lithiumcarbonat und 1.68 g reine Harnsäure lösen, filtrieren. Von dieser Lösung zu 75 cm³ des verflüssigten Agars 15 cm³ und 10 cm³ Aqua dest. setzen, zu starke Alkaleszenz mit Normalschwefelsäure abstumpfen (gewöhnlich 1 cm³ auf 100 cm³ Agar). Bruttemperatur nach Aussaat.

Säurebildner werden durch Bildung typischer Harnsäurekonglomerate angezeigt: nach 15 Stunden im Inneren der Kolonien und in der Umgebung makroskopisch Krystalle wahrnehmbar, nach 24 Stunden ist die Kolonie von ihnen bedeckt (*B. typhi*, *coli*, *ac. lactici*). Alkalibildner (*B. faec. alcalig*) bewirken keine Ausscheidung.

Flüssige Nährmedien,

vornehmlich zur Unterscheidung der Diphtheriebakterien (s. auch I., S. 701).

Zuckerpeptonwasser nach *M. van Riemsdijk*⁵³: Enthält keine Fleisch- oder Serums substanz. Pepton sicc. Witte 1% und Kochsalz 0.5% werden gekocht und nach Lösung filtriert; Lackmustinktur 6% + Traubenzucker 1% etwa 20 Minuten gekocht und dem Filtrat zugesetzt, die alkalische Lösung wird mit Milchsäure neutralisiert (violette Färbung). Ebenso können andere Kohlehydrate verwendet werden, insbesondere Lävulose, Mannose, Mannit, Inulin, Lactose (diese drei durch Diphtheriebacillen nicht gesäuert).

Thielsche Nährlösung⁵⁴: Pepton sicc., Nutrose (Kaseinnatriumphosphat) je 1 und Kochsalz 0.5 g in 100 Wasser im Dampftopf $1\frac{1}{2}$ Stunden kochen, einen Trichter mit Wattefilter gleichzeitig mitsterilisieren. Absetzen lassen, die überstehende Flüssigkeit auf das Filter gießen, dazu 5 g Lackmuslösung, die 5 Minuten mit Trauben-

zucker 1 g (im Reagensglas) gekocht hat, hinzufügen, alkalisieren bis zum Lackmusneutralpunkt und mit 2 cm³ einer 1%igen Sodalösung alkalisieren, durch Papierfilter filtrieren, in sterile Reagensgläser abfüllen, nochmals 10—15 Minuten im Dampf sterilisieren. (Nach der ursprünglichen Vorschrift wird alles zusammengemischt und an drei Tagen hintereinander je 20 Minuten sterilisiert.) Impfung der blauen klaren Flüssigkeit mit je einer Öse einer eintägigen Kultur.

Diphtheriebacillen deutliche Rötung und Trübung nach 24 oder mehr Stunden. Pseudodiphtherie- und Xerosebacillen blau und klar auch nach mehreren Tagen, nie Trübung oder Rötung nach einem Tage.

Statt Traubenzucker werden nach Bedarf andere Kohlehydrate verwendet (Mannose, Lävulose).

Diphtheriebacillen spalten diese, Pseudodiphtheriebacillen keine der Zuckerarten (keine Rötung⁵⁵).

Nährmedien,

vornehmlich zur Unterscheidung der Bakterien der Typhus-, Koli- und Ruhrgruppe dienend, aber auch zu derjenigen der Kokken verwendet (zum Teil auch nach bestimmten Methoden zur Isolierung von Bakterienarten und Gemischen geeignet):

Lackmusmilchzucker (einfacher) nach W. v. Drigalski⁷:

Behandlung des Fleisches zur Herstellung des Fleischwasser-Pepton-Agars s. oben S. 694. Der zerkleinerte Agar soll einen Tag lang vor Zusatz zu der Nährbouillon gut zerkleinert in etwas Wasser im Brutschrank quellen; es genügen 1½—2% Agar.

Der flüssige schwachalkalische Nähragar (1 Pfund Fleisch auf 1 l, 1% Pepton, 0.5 Kochsalz) wird mit 13% Lackmuslösung (Kahlbaum) und 1—1.5% Milchzucker (chemisch rein) vermischt, nachdem das Kohlenhydrat 15 Minuten mit der Lackmuslösung gekocht wurde. Bei saurer Reaktion Herstellung schwach alkalischer mit Sodalösung. Die verwendeten Wattefilter, Kölbchen und Reagensgläser sollen vorher sterilisiert sein. Abfüllen in Reagensgläser oder eventuell in kleine Petrischalen.

Differentialdiagnostische Verwendung: Zeigt einmal die Reduktion des Lackmusfarbstoffes (Entfärbung, Bildung von „Leukoblau“), außerdem das Verhalten der geprüften Stämme gegenüber Milchzucker an. „Farbloses“ Wachstum, wie oft angegeben, kommt in Wirklichkeit nicht vor, eine Reaktion (alkalische durch vorwiegenden Eiweiß-, saure durch überwiegenden Zuckerabbau) wird stets vorherrschen.

Blaues Wachstum: Typhus-, Enteritis-, Ruhrgruppe, B. faec. alcaligen., B. pseudotuberc. rodentium, V. cholerae; desgl. (bei nicht zu lange künstlich fortgezüchteten Kulturen) charakteristische Schleimbildung: Str. mucosus (s. unten)⁵⁷ und Paratyphus B im Unterschied zu B. enteritidis (Gärtner-Gruppe⁵⁶).

Rötung: Die meisten Stämme der Koligruppe, einige mit gleicher Schleimbildung wie Paratyphus B; B. lactis aerogenes; Str. viridans.

Zusatz von Nutrose oder Tropone ist nicht nötig, erhöht aber den Nährwert und damit die Wachstumsenergie mancher Bakterien und beschleunigt damit die Fermentierung. Dagegen ist es falsch, bei

differentialdiagnostischer Verwendung des Lackmusmilchzucker-Agars Krystallviolett, das auf viele Keime stark hemmend wirkt, hinzuzusetzen! Nach unseren Erfahrungen gibt es jetzt überhaupt kein Präparat von Krystallviolett mehr, das z. B. den *B. typhi* ungeschädigt läßt, wie seinerzeit das von *Conradi* und mir 1901 angegebene Präparat. Wir erachten daher den Zusatz jetzt auch für Nachweiszwecke als schädlich.

*E. Fränkel*⁵⁷ bestreicht zur Züchtung und Differenzierung von Kokken, besonders *Streptococcus mucosus*, die Oberfläche des *v. Drigalski*-Agars mit sterilem Rindertalg. Ganz analog werden zahlreiche Arten von Zuckeragar hergestellt, unter denen die mit Mannit und Maltose wohl die gebräuchlichsten sind. (Literatur und Anwendung s. unter anderm bei *Bieling*⁵⁸, *v. Drigalski*⁵⁶, *Hübner*⁷¹, *W. Pfeiler*⁷².)

Endo Modifikation des „Drigalski-Agar“ (s. oben)

kann gleichfalls zu differentialdiagnostischen Zwecken benutzt werden, hält sich aber nicht lange und wirkt infolge des Fuchsinulfitlehthaltes auf manche empfindliche Arten hemmend. Auch hier genügen 1½–2% Agar. Säurebildung aus Milchzucker = Rötung.

Abänderung nach Liebermann und Acel⁶⁰:

Als Indicator wird Kongorot, 3 g auf 1 l zugesetzt: Säuerung wird durch blauschwarze Färbung angezeigt.

Die Abänderungen nach *F. Löffler*, *Padlewski*, *Erich* und *Kindborg* s. oben; zu differentialdiagnostischen Zwecken wenig gebraucht.

Fuchsinulfitagar nach *Endo* bereitet, mit 1% Traubenzucker statt Milchzucker, von *W. Gaethgens*⁶¹ verwendet:

B. typhi rot, *B. faecal.* alkalig. farblos;

desgleichen Fuchsintraubenzuckergelatine und -bouillon.

Fuchsinbouillon mit Kohlehydrat nach *W. Stern*⁴³:

Es werden versetzt eine Bouillon (bereitet mit 2% Pepton, 1% Fleischextrakt, 0.5% Kochsalz, basisch gemacht bis zum Phenolphthaleinpunkt, gekocht, filtriert), 100 cm³, mit 5–6 Tropfen gesättigter alkoholischer Fuchsinlösung (10 Fuchsin in 100 Alkohol 24 Stunden bei 37°, dann filtriert), 2 cm³ einer 10%igen wässrigen Natriumsulfitlelösung (frisch bereitet!) und 0.5–1 cm³ einer 0.25%igen wässrigen Chrysoidinlösung (die nur zur „Schönung“ dient). Dann Zusatz von Kohlehydraten in einer Menge von 1%; wird Glycerin genommen, so wählt man 2%. In Reagensgläsern sterilisieren; warm = rot, kühl = goldgelb. Rosafarbe zeigt Unbrauchbarkeit der Lösung an, die nicht sehr haltbar ist. Literatur s.⁴⁴.

Fuchsinulfitagar nach *S. Svestka*⁶²:

25 cm³ eines 3%igen Nähragars, 75 cm³ Bouillon und 0.05 g Nutrose werden vermischt und eine Stunde in Dampf belassen. Zusatz von 0.4 g Traubenzucker und 3 g Galaktose, 5 Minuten im Dampftopf lassen, mit der Pipette 6 Tropfen einer 10%igen alkoholischen Fuchsinlösung zufügen und mit 11 cm³ einer frisch bereiteten 10%igen Lösung von nicht verwittertem krystallförmigen Natriumsulfitle entfärben, in Röhrchen abfüllen, kurz sterilisieren. Anlage von Schüttelkulturen. Nach 12 Stunden *B. typhi*: rosa; *Paratyphus A*: farblos bis schwachrosa, wenig Gas; *Paratyphus B* intensiv rot, starke Gasbildung.

Serum- oder Ascitesnährmedien mit Kohlehydratzusatz:

Modifikation des Löfflerschen erstarrten Serums s. oben S. 705. Desgleichen nach W. v. Lingelsheim⁶³: Lackmuslösung 50 cm³ wird mit 5 cm³ eines Kohlehydrates (Maltose, Lävulose oder Dextrose) kurze Zeit gekocht und dann mit 2·5 cm³ Normal-sodalösung versetzt; hierzu 300 cm³ eines 3%igen Nähragars und nach Abkühlen bis auf 50° noch 100 cm³ Ascitesflüssigkeit, in Schalen gießen und frisch verwenden.

Bei Herstellung kleinerer Mengen: 1 g Zucker in 10 cm³ Lackmuslösung kochen, abkühlen, Zusatz von 0·5 cm³ steriler Normalsodalösung; von dieser Mischung je 1·5 cm³ zu je 13·5 cm³ des noch flüssigen Ascitesagars setzen, Platten gießen⁶⁴.

Meningokokken vergären Maltose und Dextrose (Rötung). Gonokokken nur Dextrose, Micrococcus catarrhalis keinen der 3 Zucker, Diplococcus pharyng. sicc. alle 3 (Rötung), Micrococcus pharyng. ciner. keinen, von Diplococcus pharyng. flav. 2 Arten vergärend, eine nicht oder wenig. — Auch für Streptokokkendifferenzierung gebraucht, Literatur s. ⁶⁵; Pneumokokken röten nicht.

Flüssige Serumzuckermischung nach Hanna⁶⁶:

Rinderserum mit 10fachem Zusatz von Aqua dest. wird im Dampftopf sterilisiert, alsdann Zusatz von 1% eines Kohlenhydrates nach Wahl, in Reagensgläser abfüllen, kurze Zeit im Dampf halten. — Säurebildner fällen das Eiweiß aus.

Milchbouillon mit Galaktose (R. Bieling⁵⁸): Magermilch wird fraktioniert drei Tage lang im Dampf sterilisiert, dann mit 1—2 Teilen Nährbouillon und 2—3% Galaktose gemischt. Einstellung auf schwach saure Reaktion.

Nach 18—24 Stunden bewirken B. typhi und Paratyphi B Gerinnung, B. paratyphi A noch nach 40 Stunden keine Gerinnung.

Seruminulinbouillon nach Ph. H. Hiß⁶⁷: 2 Nährbouillon + 1 Serum; zu 100 Teilen davon 6 Lackmustinktur, in der ein Teil Inulin gekocht wurde.

Pneumokokken bilden Säure (Rötung), Streptokokken nicht.

Lackmuskohlehydratbouillon: Nährbouillon, schwach alkalisch, mit Zusatz von Lackmustinktur (4—5%) und 0·5—2% (Durham, v. Angerer⁸²) von Kohlehydraten, kurze Zeit sterilisiert (z. B. im Autoklaven, nachdem der strömende Dampf 5 Minuten entwichen und dann das Ventil geschlossen worden ist, noch 2 Minuten belassen, nachdem $\frac{1}{2}$ Atmosphäre erreicht wurde), wird zu mannigfachen differentialdiagnostischen Zwecken verwendet.

Zur Unterscheidung der Bakterien der Typhus- und Ruhrgruppe⁸², der Streptokokken (Literatur ⁶⁵ und ⁸³).

Von den zusammengesetzten flüssigen Nährböden sind ferner die wichtigsten milchzuckerhaltige, welche auf dem Prinzip der Petruschkyschen Lackmusmolke beruhen, diese zu ersetzen oder zu ergänzen suchen.

Die Lackmusmolke nach *J. Petruschky*⁶⁸ stellt eine wichtige Verbesserung der zuerst von *L. Buchner*⁶⁹, dann von *Löffler*, *Behring* u. a. untersuchten kohlehydrathaltigen mit Lackmus gefärbten Nährmedien dar und ist bei der Feststellung der zur Typhus-, Ruhr-, Enteritis- und Koligruppe gehörigen Stämme noch heute das wichtigste und feinste Kulturmittel. Ihre Zusammensetzung, von der Milch als Ausgangsmaterial abhängig, gelingt nie ganz gleichmäßig. Auch das beste fabrikmäßig hergestellte Produkt, die *Kahlbaumsche Lackmusmolke*, ist in ihren verschiedenen Lieferungen nicht ganz gleichmäßig. Zu feineren vergleichenden Untersuchungen muß man daher eine Molke derselben Herstellung oder Lieferung verwenden. Die Selbstanfertigung ist nicht ganz einfach, aber doch keineswegs derart schwierig, wie vielfach angenommen wird. Ursprüngliche Vorschrift von *J. Petruschky*: Ganz frische Milch etwas erwärmen und mit so viel stark verdünnter Salzsäure versetzen, daß das Kasein ausfällt. Durch Filtrierpapier filtrieren, mit Natronlauge oder Sodalösung so weit neutralisieren, daß rotes Lackmuspapier bläulich, blaues rötlich wird (also nicht alkalisieren!), 1—2 Stunden kochen, so daß der Kaseinrest ausfällt, dann sorgfältig mehrmals filtrieren, bis zur völligen Klarheit. Zusatz von 5% Lackmusmolke, dabei muß die Lösung völlig neutral und rötlichviolett gefärbt sein. Abfüllen in sterile Reagensgläser, kurze Zeit (etwa 10 Minuten) nachsterilisieren im Dampftopf. Schon *Petruschky* gibt an, daß vor dem Kochen nicht unnütz viel Alkali zugesetzt werden dürfe (vgl. *E. Seitz*⁶ u. unten); ebenso wie *Capaldi* und *Proskauer* sah er von einem Zusatz von 50% Wasser keinen Nachteil.

Zu der Vorschrift ist zu bemerken, daß Magermilch genommen wird; daß zur Neutralisierung nach der Kaseinausfällung Normalnatronlauge verwendet und unnötiges Kochen so weit als möglich (wegen der Gefahr der Milchzuckerzersetzung) vermieden wird. Prüfung der fertigen Röhrchen mit je etwa 5 cm³ auf Sterilität im Brutschrank. Eine derart sorgfältig selbstbereitete Molke gibt durchaus gute Resultate. Verwendung: Nicht zu geringe und bei Vergleichung möglichst gleiche Kulturmengen einimpfen, die Menge der Einimpfung ist nicht gleichgültig. Das *Kahlbaumsche* Präparat gibt meist gute Resultate.

B. typhi *Koch-Eberth*, *Paratyphus A*, *Dysenteriebacillen Kruse*, *Y* und *Flexner* wachsen in charakteristischer Weise mit geringer, aber gegenüber unbeimpften Neutralröhrchen deutlich erkennbarer Rötung und ganz geringer Trübung, die Molke bleibt „spiegelnd und fast klar“. *B. coli*: fast alle Stämme erzeugen deutliche Trübung und Rötung. *B. faec. alcalig.*: deutliche Trübung und Blaufärbung; *B. Paratyphi B* und die Gruppe der *Bact. enteritidis* anfangs mit mäßiger Trübung (geringer als bei *B. coli*) und Rötung, Farbumschlag in blau nach einigen Tagen. *B. typhi* erzeugt nie nach Tagen, selten nach Wochen Umschlag in Blau⁷³.

Den komplizierten Mechanismus der Farbenreaktion hat schon bezüglich der Säurebildung durch *B. typhi* *Smith*⁷⁴ aufzuklären gesucht durch Annahme eines zweiten, in seiner Konstitution nicht bekannten

Kohlehydrats in der Milch. *E. Seitz*⁶ hat in sorgfältigen Untersuchungen den Nachweis des Vorhandenseins eines solchen Kohlehydrats wie auch des Ursprungs der Alkalibildung erbracht (s. oben).

Literatur und Verhalten der Bakterien der Typhusgruppe nach sehr ausgedehnten Untersuchungen s. auch bei *Boit*⁷³, ferner ^{56, 71, 72}.

Die eiweißfreie Mannitsalzlösung von *Capaldi* und *Proskauer*⁷⁰, als Verbesserung der Molke angegeben, hat vorwiegend historisches Interesse.

Nährlösung I: Asparagin und Mannit je 0·2%, Kochsalz 0·02%, Magnesiumsulfat 0·01%, Calciumchlorid 0·02%, Monokaliumphosphat 0·2%, lösen in destilliertem Wasser, 1½ Stunden im Dampftopf kochen, mit Natronlauge vorsichtig neutrale Reaktion herstellen, Lackmuslösung bis zur „gesättigt rotvioletten Färbung“ des Ganzen zusetzen, abfüllen, noch ½ Stunde kochen. — Lösung II: Pepton sicc. Witte 2% und Mannit 0·1%; nach dem Kochen mit Citronensäure neutralisieren, sonst wie I behandeln.

Verwendung: *B. typhi* in I kein Wachstum und dementsprechend keine Säuerung, *B. coli* in I Säuerung, in II nicht sauer. „Alkalibildner verändern nicht die Reaktion in II“ (Irrtum! Verf.).

Nach einem einigermaßen gleichwertigen Ersatz der *Petruschkyschen* Lackmusmolke haben viele Autoren gesucht (s. unten). Einen sowohl aus wirtschaftlichen Gründen (Milchknappheit!) wichtigen wie experimentell vollständig genügenden bietet nur die

Künstliche Lackmusmolke von *E. Seitz*⁶:

- 20·0 Milchzucker, chemisch rein
- 0·4 Traubenzucker
- 0·5 Dinatriumphosphat
- 1·0 Ammoniumsulfat
- 2·0 Natriumcitrat (3 basisch)
- 5·0 Kochsalz
- 0·05 Pepton sicc. Witte
- 0·25 Azolithmin (*Kahlbaum*)
- 1000·0 Aqua dest.

Die Lösung abfüllen in sterile Reagensgläser (zu je 6—8 cm). ½ Stunde (nicht länger!) bei 100° halten. Farbe bläulichviolett (neutral). Auch *Seitz* hebt hervor, daß nicht zu geringe Mengen der betreffenden Bakterienreinkultur eingimpft werden sollen.

Wir haben in größeren Feldlaboratorien zwei Jahre hindurch die *Seitzsche* Lösung geprüft und sie für experimentell-diagnostische Zwecke der *Petruschkyschen* Lackmusmolke (*Kahlbaum*) an sich als völlig gleichwertig, infolge der ganz konstanten Zusammensetzung aber als jener überlegen erprobt. Friedensherstellungskosten 35 bis 40 Pfennige für das Liter!

Technische Einzelheiten: Milchzucker = Säurequelle für *B. coli*; Traubenzucker = Säurequelle für *B. typhi* u. s. w. als Ersatz des unbekannten zweiten Kohlenhydrats der Molken; Dinatriumphosphat = Nährstoff, gleichzeitig zum

Zustandekommen der Farbenreaktion nötig, das zweibasische Salz wird allmählich infolge Säure- oder Alkalibildung in ein- oder dreibasisches übergeführt; Ammoniumsulfat = Stickstoffquelle; Natriumcitrat = Alkaliquelle; Pepton = wachstumbefördernd.

Für differentialdiagnostische Zwecke genügt nunmehr bei Untersuchung von Bakterien der Typhus-, Enteritis-, Ruhr-, Koligruppe und *B. faecalis alcalig.* neben Prüfung des Verhaltens auf Milchzucker-Lackmusagar (*v. Drigalski*), der Agglutination, des Wachstums auf Mannit- und Maltoseagar, Neutralrot-Traubenzuckeragar diejenige des Wachstums in *Seitzscher Lösung* (oder Lackmusmolke). Die meisten weiteren Prüfungen auf einem der nachstehend noch angegebenen Nährmedien sind im Grunde nur Wiederholungen.

Reichenbachsche Lösung⁷⁵:

5·0 Milchzucker
5·0 Kochsalz
4·0 Asparagin
2·5 Dinatriumphosphat
2·5 Pepton sicc. Witte
0·25 Azolithmin (*Kahlbaum*)
1000·0 Aqua dest.

Abfüllen zu je 10 cm³ in sterile Reagensgläser, kochen $\frac{1}{2}$ Stunde.

Zur Unterscheidung von *B. coli*-Arten durch Titrierung der gebildeten Säure mit $\frac{n}{10}$ -Natronlauge gebraucht. Atypische *B. coli* sollen unter 1 cm³ $\frac{n}{10}$ -Lauge entsprechende Säuremengen, typische 1·5—2·5 cm³ $\frac{n}{10}$ -Lauge entsprechende Säure bilden. — Nach einem Vorschlage von *J. Klein* soll Asparagin fortgelassen werden.

Nutrosemilchzucker- und Nutrose-Traubenzuckerlösungen* nach *M. Barsiekow*⁷⁶:

„*Barsiekow I*“: Eine Lösung von 1% Nutrose, 1% Traubenzucker, 0·5 Kochsalz, 10% Lackmuslösung.

„*Barsiekow II*“: Desgleichen mit 1% Milchzucker statt Traubenzucker. Herstellung für einen Liter berechnet: Zu 1000 cm³ einer $\frac{1}{2}$ %igen Kochsalzlösung wird Nutrose gesetzt; u. zw. sollen 10 g des Pulvers mit ein wenig der Kochsalzlösung in der trockenen Reibeschale vorsichtig angerieben werden (s. *L. Heim*⁸⁷), bis alle Klumpen beseitigt sind und allmählich mehr Kochsalzlösung hinzukommt, so daß das an der Schale haftende Pulver davon aufgenommen wird, bis 100 cm³ verwendet sind. Diesen Brei den übriggebliebenen 900 cm³ zusetzen, eine bis zwei Stunden im Dampftopf lassen, vom Bodensatz auf ein mit

* Die Angabe *L. Heims* (Lehrbuch), diese Lackmusnutroselösung sei die „Grundlage für den Lackmuslactoseagar“ gewesen, ist vollkommen irrig. Das Gegenteil ist Tatsache: Mai 1901 war das Nachweisverfahren von *W. v. Drigalski* mit Hilfe von Lackmusmilchzucker-Agarplatten bereits praktisch in Anwendung (Nachweis einer Ruhrepidemie) für Typhus und Ruhr, Herbst 1901 dasjenige von *W. v. Drigalski* und *H. Conradi* mit Hilfe der gefärbten Nutroseagar-Milchzucker-Krystallviolett-Platten. Hierauf baute erst *Barsiekow* auf!

Aqua dest. angefeuchtetes Faltenfilter abgießen, zu dem Filtrat 50 cm^3 einer Lackmuslösung gießen, welche vorher mit 10 g des betreffenden Zuckers 15—20 Minuten gekocht hat. Neutrale Reaktion mit $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge herstellen (Proben mit 10 cm^3 in Reagensglas, rötlich-violette Farbe!), zu je 6 cm^3 in sterile Reagensgläser abfüllen, höchstens 30 Minuten im Dampftopf sterilisieren.

Differenzierung: In Traubenzucker-Lösung (I) bewirken die Bakterien der Typhus- und Ruhrgruppe Rötung und Trübung (diese nicht stets), *B. faec. alcalig.* keine oder schwach blaue Verfärbung, *B. coli* Rötung, Gerinnung und Gasbildung; in Milchzucker-Lösung (II) die meisten Arten von *B. coli* Rötung, Gerinnung, Gasbildung, die übrigen „verändern nicht“ (machen jedenfalls weder wahrnehmbare Säuerung noch Gerinnung). — Schon die Lackmusmilchzuckerplatte und Lackmusmolke (Seitzsche Lösung) zeigen mehr an (Verf.).

Abänderung der vorigen nach *R. Doerr*⁷⁷: Mannit 1·0, Kochsalz 0·5, Nutrose 1·0, Aqua dest. 100·0, eine Stunde kochen, filtrieren, Zusatz von 3 cm^3 Lackmuslösung, neutrale Reaktion. Abfüllen in Röhrchen und im Dampf an zwei Tagen je 15 Minuten sterilisieren.

Zur Unterscheidung der Bakterien der Ruhrgruppe: *B. Kruse-Shiga* verändert nicht, *Y* und *Flexner* röten deutlich nach 24 Stunden.

Desgleichen nach *H. Hetsch*⁷⁸: in ähnlicher Weise wie *Barsiekow*-Lösungen werden hergestellt je eine Lösung von 1% Nutrose, 0·5% Kochsalz, 5% Lackmuslösung, 2% Mannit oder 2·5% Maltose. Die Nutrosekochsalzlösung wird 2 Stunden, die Lackmuslösung mit dem Kohlehydrat 10 Minuten lang gekocht, dann nach Abkühlen auf etwa 50° miteinander vermengt, in sterile Reagensgläser gefüllt, sofort noch $\frac{1}{4}$ Stunde im Dampf sterilisiert. Mannitlösung bläulichviolett, Maltoselösung rotviolett.

B. Kruse-Shiga rötet keinen Nährboden, *Y* nur Mannit, *Flexner*, die Typhus- und die *B. enteritidis*-Gruppe Mannit und Maltose.

Einfacher und ebenso erfolgreich ist der schon 1901 von *v. Drigalski* und *H. Conradi* gleichzeitig angewendete 1%ige Mannit- bzw. Maltoseagar mit Lackmus zu verwenden.

F. Löfflers Grün- u. s. w. Lösungen⁷⁹:

1. „Typhuslösung“: 800 cm^3 Wasser mit 40 g Pepton sicc. und 20 g Traubenzucker bis zur Lösung kochen. Zusatz von 30 cm^3 Normalkalilauge sowie 200 cm^3 heißen Wassers, in das 20 g Nutrose eingequirlt sind. Dazu endlich 100 g Milchzucker mischen, in 100 g-Kölbchen verteilen und 3 Tage lang je 10 Minuten kochen. Zum Gebrauch in 100 cm^3 dieser erkalteten Lösung 1 cm^3 steriler 0·2% iger wässriger Malachitgrünlösung einbringen, abfüllen in Röhrchen zu je etwa 4 cm^3 .

2. „Paratyphuslösung“: Genau wie 1. doch ohne Traubenzucker.

In „Typhuslösung“ (1): Enteritis, Paratyphus A und B und Colibakterien Gärung innerhalb 24 Stunden mit Gasbildung, oben grüner Schaumring, die Nutrose wird in schmutzigen Flocken ausgefällt; *B. typhi*: Gerinnung in toto wie bei Milch mit überstehender klarer grüner Flüssigkeit. — In Para-

typhuslösung (2): *B. coli* vergärt, bildet oben grünen Schaumring, Typhus und Paratyphus A beeinflussen gar nicht, Paratyphus B und *B. enteritidis* vergären nicht, aber entfärben langsam.

Abänderungen (Löffler): a) Zu 100 cm³ der Lösung 2 (Pepton-, Nutrose-, Milchzucker-Malachitgrünlösung [ohne Dextrose], der „Paratyphuslösung“), wird 1 cm³ einer 0·2%igen Safraninlösung (Grübler) zugesetzt. Grauviolette Flüssigkeit.

Ergebnisse: *B. coli* vergärt; Typhus und Paratyphus A etwas dunkler färbend, Paratyphus B schreiend hellrot (Reduktion des Malachitgrün); *B. typhoides duplex* (paracoli) fällt in beiden Lösungen Nutrose ohne Gärung aus.

b) Zu beiden Lösungen (1 und 2) zusetzen auf je 100 cm³: 1 cm³ 0·2%ige Safraninlösung, 2 cm³ 0·2%ige Malachitgrünlösung, 3 cm³ 1%ige Reinblaulösung.

Nach 24 Stunden Lösung I (mit Traubenzucker): *B. typhi* blaue Ausfällung, schwach violett; Paratyphus A Trübung, schwache Gärung; Paratyphus B starke Gärung, blaurot; Gärtner- und Mäusetyphus starke Gärung, blaurot; *Coli* starke Gärung, blaurot; *B. duplex* (paracoli) blaue Ausfällung. Nach 24 Stunden Lösung II (ohne Traubenzucker): *B. typhi* unverändert; Paratyphus A unverändert; Paratyphus B hellrot; Gärtner- und Mäusetyphus hellrot; *Coli* starke Gärung, Flüssigkeit blau, trübe; *B. duplex* (paracoli) blaue Ausfällung am Boden, Flüssigkeit darüber trüb.

c) Desgleichen zu beiden Lösungen Zusatz von je 1 cm³ 0·2%ige Safraninlösung und 3 cm³ Reinblaulösung (kein Grün).

Typhus und Paratyphus A in Lösung I blaue Ausfällung, in II dunkelviolett; Typhus nach 36 Stunden himbeerrot, Paratyphus A violettblau; Paratyphus B, Gärtner- und Mäusetyphus vergären und fallen blau in Lösung I, himbeerrot in II; *B. coli* in I desgleichen, in II Vergärung, violette Fällung und Flüssigkeitsfärbung.

Einen der *Petruschkyschen* Lackmusmolke überlegenen Ersatz glauben zur Differenzierung für die Typhus-, Koli- und Ruhrbakteriengruppe *Mayer* und *Knorr*⁸⁰ gefunden zu haben in einem mit

Lackmus gefärbten Lactose-Mannit-Dextrose-Peptonwasser, enthaltend: Pepton sicc. Witte 2%, Kochsalz 0·5%, Milchzucker 0·4%, Mannit 0·01%, Traubenzucker 0·01%, Lackmuslösung 4—5%. Herstellung: Pepton wird nach *L. Heim* (s. oben) in der Reibschale mit zunächst wenig Kochsalzlösung angerieben (Pistill soll nicht die Schalenwand berühren), wenn keine Klumpenbildung mehr besteht, mehr Flüssigkeit zugeben, bis zu 50 oder 100, diese Aufschwemmung der übrigen Kochsalzlösung zusetzen, eine Stunde im Dampftopf kochen; filtrieren, nochmals 20 Minuten sterilisieren. In etwa 40 cm³ dieses Peptonwassers werden die drei Kohlehydrate eingebracht, für 20 Minuten in den Dampftopf gestellt, mit der Peptonkochsalzlösung zusammengegossen. Zu dem Ganzen 4—5% Lackmuslösung setzen, „so daß die Dichte der Lackmusmolke erreicht wird“. Reaktion ganz schwach alkalisch einstellen. Abfüllen der gut gemischten farbigen Lösung in

sterile Reagentgläser mit umgekehrt eingestellten sterilen kleinen Röhren (nach *Ficker*) als Gärröhrchen. In den dampfenden Autoklaven bringen, Druck bis $\frac{1}{2}$ Atmosphäre steigen lassen (dauert etwa 10 Minuten), dann noch weitere 2—3 Minuten sterilisieren*.

Ausfällung und Reduktionsvorgänge sollen in den Gärungsröhrchen vorteilhafter als sonst abzulesen sein.

Verwendung: Nach 18—37 Stunden 1. B. Shiga-Kruse keine Farbenveränderung; 2. B. typhi leichte Rötung, ähnlich 1; 3. Paratyphus A und Pseudodysenterie violettrot, „meist klar“; 4. Paratyphus B leicht gebläut, in Gärröhrchen Reduktion wahrnehmbar; 5. *Proteus* gleich 4; 6. *Glässer-Voldagsen* (B. typhi suis) geringere Reduktion, sonst gleich 4; 7. B. coli schon nach 6 Stunden hellrot, Gas.

Aus diesen nach *Mayer* und *Knorr* wiedergegebenen Ergebnissen ist gegenüber *Seitzscher* Lösung oder *Petruschkyscher* Lackmusmolke keine Überlegenheit erkennbar (Neutralrottraubenzuckeragar ist zur Identifizierung des B. paratyphi A auch hier nötig).

Die Erhitzung aller Kohlehydratnährböden und -lösungen soll eine halbe Stunde nicht überschreiten (s. oben). Hat man nur sterile Reagenzien, Lösungen und Gläser verwendet, so wird das in den meisten Fällen genügen, doch empfiehlt sich Prüfung vor Verwendung durch Aufenthalt im Brutschrank. „Selbstentfärbung“ von Lackmusfarbstoff, in der Tiefe der Nährböden bemerkbar, ist durch Lösen und Schütteln mit Luft zu beheben. Zur Vermeidung unnötiger Erhitzung füllt man feste oder halbfeste kohlehydrathaltige Nährböden grundsätzlich in kleine Gefäße (kleine Erlenmeyersche Kolben) zur Aufbewahrung ab.

Aus nach den oben erwähnten leicht verständlichen Gründen sind „Dauer-“ oder „Trockennährböden“ dieser Art im allgemeinen wenig tauglich. Man stellt im Bedarfsfall die Nährmedien (Agar) aus Dauerpräparaten her, mischt aber auch unter primitiven Verhältnissen (auf dem Lande, bei Auslandsexpeditionen) die Kohlehydrate und Indikatoren (besonders Lackmuslösung oder Azolithmin) gern erst kurz vor Gebrauch an Ort und Stelle mit jenen.

Lackmuslösung nach *Kubel* und *Tiemann*⁸¹ kann folgendermaßen bereitet werden, wenn man nicht das sehr gute und haltbare Präparat von *Kahlbaum* (Berlin) beziehen will:

Der gepulverte käufliche Lackmusfarbstoff wird wiederholt mit heißem, destilliertem Wasser behandelt. Die wässrigen Auszüge werden behufs Zersetzung der darin vorhandenen Carbonate (Kaliumcarbonat) mit Essigsäure gelinde übersättigt und auf dem Wasserbade bis zur Konsistenz eines dicken Extraktes, keineswegs aber bis zur Trockenheit eingedampft. Den schwerflüssigen Rückstand verdünnt man allmählich mit 90%igem Alkohol, bringt das Gemisch in einen Kolben und fügt eine reichliche Menge 90%igen Alkohols hinzu. Es wird dadurch der gegen Säuren und Basen äußerst empfindliche Farbstoff gefällt, während ein weniger empfindlicher roter Farbstoff und Kaliumacetat in Lösung gehen. Man filtriert und wäscht mit Alkohol aus. Der zurückbleibende Farbstoff wird in destilliertem Wasser unter Erwärmen gelöst und die Lösung filtriert.

* Endsterilisierung statt im Autoklaven besser 20 Minuten im Dampf. v. D.

Sie ist in diesem wässerigen Zustande nicht gut haltbar, man versetzt sie daher vorteilhaft, wie es wahrscheinlich auch *Kahlbaum* tut, mit etwa 10—15% Alkohol (96%ig). Beim Aufkochen (s. oben) wird der Spiritus dann vor Gebrauch größtenteils verjagt.

Bezugsquellen für fertige differentialdiagnostisch verwendbare Nährböden: E. Merck (Darmstadt) für „Ragit-Drigalski-Agar mit und ohne Krystallviolett“ und für „Ragit-Barsiekow-Nährböden“ nach E. Marx und W. Eichholz⁸⁴. Die besonderen Eigenschaften der Nutrose sollen in die Präparate übernommen worden sein. Ferner werden Traubenzucker- und Milchzuckertabletten zu 25 g geliefert, „Endo-Tabletten“ für je 100 g Fuchsin-Milchzucker-Agar. — Die Behring-Werke (Marburg a. L.) liefern Konservennährböden nach *Uhlenhuth* u. *Messerschmidt*.

„Bram“, Chemische Fabrik in Ölzschau bei Leipzig liefert als Trockennährböden (nach *Doerr*): Lackmusagar ohne Zucker, Lackmuslactoseagar (ohne Krystallviolett) nach v. *Drigalski*, desgleichen nach *Endo*, Oldekop-(Neutralrot)-agar, Kongorotagar nach *Liebermann* und *Acel*, Lackmusmaltoseagar, desgleichen -Mannitagar, desgleichen -Saccharoseagar, desgleichen Traubenzuckeragar, desgleichen Rhamnoseagar, *Löfflers* Typhus- und Paratyphuslösungen (Malachitgrünlösung), Traubenzuckeragar. — Näheres siehe bei *Doerr* in diesem Buche.

Literatur: ¹ O. Hammarsten, *Physiol. Chem.* 1907. — ² F. Röhmann, *Biochemie* 1908. — ³ A. Panormoff, *Zt. f. physiol. Chem.* 1893, XVII. — ⁴ M. W. Beijerinck, *Zbl. f. Bakt.* 1891, I, IX. — ⁵ M. Nencki u. N. Sieber, *Monatsh. f. Chem.* 1889. — ⁶ E. Seitz, *Zt. f. Hyg.* 1912, LXXI. — ⁷ W. v. Drigalski, *Veröff. a. d. Geb. d. Mil.-San.-Wes.*, H. 20. — ⁸ P. Ehrlich, *Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus*, 1885. — ⁹ W. v. Drigalski u. H. Conradi, *Zt. f. Hyg.*, XXXIX. — ¹⁰ Lockemann, *Zbl. f. Bakt.*, LVII, Ref. — ¹¹ A. Pinner, *Org. Chem.* 1890. — ¹² A. Bernthsen, *Org. Chem.* 1918. — ¹³ R. Koch, *Mitt. a. d. K. Ges.* 1881, I. — ¹⁴ E. v. Esmarch, *Zt. f. Hyg.* 1886, I; ¹⁵ *Zbl. f. Bakt.* 1887, I, I. — ¹⁶ Anzilotti, *Zbl. f. Bakt.* 1906, XL. — ¹⁷ O. Voges, *Zbl. f. Bakt.*, XIII. — ¹⁸ P. G. Heinemann, *Zbl. f. Bakt.* 1907, II, XL, Ref. — ¹⁹ Morgenroth, *Berl. kl. Woch.* 1916. — ²⁰ F. Neufeld, *Zt. f. Hyg.*, XXXIV. — ²¹ H. Zipfel, *Zbl. f. Bakt.*, LVII. — ²² K. Baerthlein, *Zbl. f. Bakt.*, LXXIV. — ²³ H. Schottmüller, *M. med. Woch.* 1903. — ²⁴ Boxer, *Zbl. f. Bakt.* 1905, XL. — ²⁵ Mandelbaum u. Heinemann, *Zbl. f. Bakt.* 1910, LIII. — ²⁶ Nieter, *M. med. Woch.* 1908. — ²⁷ Schottmüller, *M. med. Woch.* 1910. — ²⁸ Koch u. Pokschischewsky, *Zt. f. Hyg.* 1913, LXXIV. — ²⁹ C. Fermi, *A. f. Hyg.*, XII. — ³⁰ C. I. Rothberger, *Zbl. f. Bakt.* 1898, XXIV. — ³¹ W. Scheffeler, *Zbl. f. Bakt.*, XXVIII. — ³² A. Oldekop, *Zbl. f. Bakt.* 1904, XXXV. — ³³ O. Heller, *Zbl. f. Bakt.*, XXXVIII. — ³⁴ W. Rosenthal, *Hyg. Rundschau* 1906. — ³⁵ A. Corsini, *Zbl. f. Bakt.*, XXXIX, Ref. — ³⁶ Buchanan, *14. int. Hyg. Kongr. Berlin* 1907, IV. — ³⁷ Fr. Müller, *Zbl. f. Bakt.*, XXV, XXVI. — ³⁸ v. Sommaruga, *Zt. f. Hyg.* 1892, XII. — ³⁹ W. H. Schultze, *Zbl. f. Bakt.* 1910, LVI. — ⁴⁰ Klett, *Zbl. f. Bakt.* 1900, XXVII. — ⁴¹ R. Ziellecky, *Zbl. f. Bakt.* 1902, XXXII. — ⁴² Omeliansky, *Zbl. f. Bakt.* 1903, XXXIV. — ⁴³ W. Stern, *Zbl. f. Bakt.* 1916, LXXVIII. — ⁴⁴ L. Michaelis, *Deutsche medizinische Wochenschrift* 1920, Nr. 45. — ⁴⁵ Buchholz, *Zt. f. Hyg.* 1907, LVI. — ⁴⁶ Frégonneau, *Zbl. f. Bakt.* XLIX. — ⁴⁷ A. Mankowski, *Zbl. f. Bakt.* 1900, XXVII. — ⁴⁸ I. Bronstein u. G. N. Grünwald, *Zbl. f. Bakt.* 1902, XXXII. — ⁴⁹ Berghaus, *Hyg. Rundschau* 1906, XVI. — ⁵⁰ B. Kisch, *Wr. kl. Woch.* 1918, Nr. 21. — ⁵¹ Maunu af Heurlin, *M. med. Woch.* 1914. — ⁵² I. L. Burchardt u. M. L. Enriquez, *Zbl. f. Bakt.*, LXXX. — ⁵³ M. van Riemsdijk, *Zbl. f. Bakt.* LXXV. — ⁵⁴ Thiel, *Hyg. Rundschau* 1907. — ⁵⁵ W. v. Przewoski, *Zbl. f. Bakt.*, LXV. — ⁵⁶ W. v. Drigalski, *Festschr. f. R. Koch*, 1903. — ⁵⁷ E. Fränkel, *M. med. Woch.* 1905. — ⁵⁸ R. Bieling, *D. med. Woch.* 1916. — ⁵⁹ Endo, *Zbl. f. Bakt.*, XXXV. — ⁶⁰ Liebermann u. Acel, *D. med. Woch.* 1914. — ⁶¹ W. Gaeth-

gens, A. f. Hyg., LXII. — ⁶² V. Svestka, M. med. Woch. 1917. — ⁶³ W. v. Lingelsheim, Klin. Jahrb. XV. — ⁶⁴ Rothe, Zbl. f. Bakt., XLVI. — ⁶⁵ Salomon, Zbl. f. Bakt. 1908, XLVII. — ⁶⁶ Hanna, J. path. and bact. V, nach Kolle-Wassermann, Handb. 1912, I. — ⁶⁷ L. Heim, Lehrb. d. Bakt. 1908, zit. — ⁶⁸ I. Petruschky, Zbl. f. Bakt. 1889, VI. — ⁶⁹ L. Buchner, A. f. Hyg. 1885, III. — ⁷⁰ A. Capaldi u. B. Proskauer, Zt. f. Hyg. 1896, XXIII. — ⁷¹ Hübner, Fleischvergiftungen und Paratyphus. Jena 1910. — ⁷² W. Pfeiler in Friedberger u. Pfeiffer, Lehrb. d. Mikrobiol. 1919. — ⁷³ Boit, Einfache und sichere Identifizierung des Typhusbacillus. Diss. Jena 1905. — ⁷⁴ Smith, Zbl. f. Bakt. 1890, VIII u. Zbl. f. Bakt., XXVI, Ref. — ⁷⁵ Reichenbach, Zt. f. Hyg., LXXVIII. — ⁷⁶ M. Barsiekow, Wr. kl. R. 1902, Nr. 44. — ⁷⁷ R. Doerr, Zbl. f. Bakt. 1903, XXXIV. — ⁷⁸ H. Hetsch, Zbl. f. Bakt. 1903, XXXIV. — ⁷⁹ F. Löffler, D. med. Woch. 1909. — ⁸⁰ O. Mayer u. M. Knorr, M. med. Woch. 1919. — ⁸¹ A. Gärtner, Hygiene des Wassers. Braunschweig 1915. — ⁸² K. v. Angerer, M. med. Woch. 1918. — ⁸³ Gordon, Zbl. f. Bakt., XXXVII. — ⁸⁴ E. Marx u. W. Eichholz, M. med. Woch. 1920. — ⁸⁵ L. Michaelis, D. med. Woch. 1921, Nr. 17 u. 24.

Trocken- und Konservennährböden.

Von Prof. Dr. **Doerr**, Basel.

Die Herstellung von Nährböden erfordert Zeit, eine voluminöse Apparatur und ein in der Technik dieses speziellen Arbeitsgebietes gut geschultes Personal. Die meisten Apparate, speziell die Heißluftsterilisatoren, die Dampfkochtöpfe, die Autoklaven sind so konstruiert, daß nur Gas als Heizstoff verwendet werden kann, und besitzen Dimensionen, welche auf die Bereitung größerer Nährstoffquanten zugeschnitten sind; braucht man nur kleine Mengen eines bestimmten Kultursubstrates, so involviert ihre Erzeugung eine beträchtliche Verschwendung an Material, Brennstoff und wohl auch an Arbeitsleistung. Ferner lassen sich die Nährböden schwer transportieren. Sie stellen flüssige oder festweiche und in diesem Falle meist Kondenswasser abscheidende Massen dar, welche man mit Rücksicht auf die oligodynamische Wirkung blanker Metalle in Glasgefäßen aufbewahrt, die man wegen der Notwendigkeit der Sterilisation oder der Verflüssigung durch Aufkochen (Agar) nicht zu starkwandig wählen darf: Bruchschäden lassen sich daher nur durch sehr sorgfältige, viel Raum und besondere Packmittel beanspruchende Emballage vermeiden. Die Schwierigkeiten des Nährbodentransportes liegen indes weniger in der Gebrechlichkeit der Aufnahmsgefäße als in der Frage, durch welchen Verschuß die Sterilität aufrechterhalten und wie dieser Verschuß an den Öffnungen der Glasgefäße transportsicher angebracht werden soll. Schon beim ruhigen Stehen in den Aufbewahrungsräumen stabiler Laboratorien werden Nährbodenvorräte durch Schimmelpilzinvasionen verdorben: umso eher wird dieses Ereignis eintreten, wenn die Gefäße beständig gerüttelt werden und wenn das flüssige Nährsubstrat (Bouillon, Kondenswasser) den Verschuß benetzt oder gar in den capillaren Spaltraum zwischen Verschuß und Flaschenhals eindringt.

Es ist selbstverständlich, daß die Mehrzahl der angeführten Übelstände für den normalen Betrieb stabiler größerer Laboratorien kaum in Betracht kommt, daß sie sich dagegen unter mobilen Verhältnissen wie z. B. im Kriege, bei Expeditionen in entfernte, minder kultivierte Gegenden, auf Schiffen und Infektionszügen sowie immer dann geltend machen werden, wenn es sich nur um die Deckung eines relativ kleinen und gelegentlich auftretenden Nährbodenbedarfes handelt (in Spitälern, in nicht-bakteriologischen Laboratorien u. s. w.). Im Kriege, speziell im

Bewegungskriege oder bei weit vorgeschobenen Laboratorien auch im Stellungskriege kann die Notwendigkeit eines beständigen, raschen Wechsels des Standortes wichtige bakteriologische Untersuchungen vereiteln, wenn man die Nährböden erst zubereiten soll; die Möglichkeit, das betreffende Material in einem für kulturelle Zwecke noch geeigneten Zustand einem Zentrallaboratorium der Operationsbasis zu übermitteln, ist auch nicht immer vorhanden.

Die Bedachtnahme auf feldmäßige Bedürfnisse war es auch in erster Linie, die mich veranlaßte, im Jahre 1909 als Erster das Prinzip der „Nährbodenkonserven“, d. h. der Umwandlung der wichtigsten Kulturmedien in transportfähige, ohne besondere Kautelen gut haltbare und vor allem im Augenblicke des Bedarfes sofort gebrauchsfertige Präparate aufzustellen. Bei der beherrschenden Stellung, welche der Nähragar in der bakteriologischen Technik einnimmt, verwendete ich zunächst diesen Nährboden als Ausgangsmaterial und suchte ihm die erwähnten Eigenschaften durch Entziehung des Wassergehaltes zu verleihen. Es wurde also zunächst Nähragar in der üblichen Art fertiggestellt, verflüssigt, auf 50—60° abgekühlt und auf große, vorher trockensterilisierte Platten aus starkem Spiegelglas ausgegossen; die Platten wurden nach dem Erstarren der Schichte in geräumige Thermostaten gebracht und dort getrocknet. Da höhere Hitzegrade unbrauchbare Produkte lieferten, ließ ich die Wasserverdampfung bei 37° ablaufen und beschleunigte sie dadurch, daß der Agar nur in niedriger (1—2 mm hoher) Schicht auf das Spiegelglas aufgebracht wurde. Infolgedessen vollzog sich die Austrocknung so rapid, daß die auf die Schicht auffallenden Luftkeime nicht zu Kolonien auswuchsen. Nach 12—20 Stunden waren die Massen in einen harten Überzug umgewandelt, der mit einem eisernen Schabinstrument abgekratzt, ein aus glänzenden Blättchen bestehendes Pulver lieferte. Dieses ließ sich beliebig lange aufbewahren, konnte auch in Metallbüchsen verpackt werden (da die oligodynamischen Stoffe nur durch Wasser von den Metallflächen ablösbar sind), war dem Verderben nicht ausgesetzt und mußte nicht peinlich steril gehalten werden. Im Bedarfsfalle kochte man einfach im Glaskolben eine bestimmte Gewichtsmenge des Nährbodenpulvers mit dem (in der Gebrauchsanweisung angegebenen) Volumen Wasser auf, wobei gleichzeitig die Abtötung der vereinzelter Keime erfolgte, welche während der Trocknung oder Aufbewahrung in die Konserve gelangt sein konnten.

Auch Spezialnährböden wie *Drigalskis* Lackmusnutrose-Milchzuckeragar oder der *Endosche* Fuchsinnatriumsulfit-Milchzuckeragar ließen sich auf diesem Wege in Pulverform bringen und durch Aufkochen in Wasser in die Ausgangsform rückverwandeln. Auf den aus den Trockennährböden angefertigten Platten und Röhrchen entwickelten sich die geprüften pathogenen Testbakterien ebenso rasch und mit denselben Eigenschaften wie auf dem Ausgangsmaterial.

Ich ließ das Verfahren patentieren, lediglich um mir die Priorität der Idee zu wahren; materiellen Gewinn habe ich daraus nie gezogen. Die gewerbsmäßige Erzeugung der Präparate übernahm die Chemische Fabrik „Bram“ in Öltschau bei Leipzig, der ich die Ausnutzung meiner Patente unentgeltlich überließ. Derzeit sind im Handel folgende nach meiner Methode dargestellte Trockennährböden zu haben:

Blutalkali-Agar nach *Dieudonné*,
 Chinablau-Agar nach *Bitter*,
 Chinablau-Malachitgrün-Agar nach *Bitter*,
 Cholera-Agar, 3%ig, stark alkalisch,
Drigalski-Agar (Lackmus-Lactose-Agar mit und ohne Krystallviolett),
Endo-Agar,
 Galle-Agar,
 Kongorotnährböden nach *Liebermann* und *Azé*, verbessert nach *Schmitz*,
 Lackmus-Maltose-Agar,
 Lackmus-Mannit-Agar,
 Lackmus-Saccharose-Agar,
 Lackmus-Glucose-Agar,
 Lackmus-Rhamnose-Agar.
 Lackmus-Nutrose-Agar ohne Zucker,
 Lackmusagar ohne Zucker,
Löfflers Typhus-Agar (Safranin-Rheinblau-Malachitgrün-Galle-Agar),
 Malachitgrün-Agar, alkalisch, für Paratyphus (speziell für Fleischuntersuchungen, gemäß der deutschen Ministerialverordnung für bakteriologische Fleischbeschau),
 Malachitgrünagar nach *Lentz-Tietz*,
 Nähragar,
 Neutralrotagar nach *Oldekop-Galli-Valerio*,
 Nährgelatine,
 Salzpeptongelatine nach *Molisch*,
 Traubenzuckeragar.

Natürlich kann man auch flüssige Nährmedien durch Abdampfen des Wassers in haltbare Konserven verwandeln, welche mit der entsprechenden Menge Wasser geeignete Nährlösungen liefern. Darauf beruht die „Trockengalle“, durch Eintrocknen von Rindergalle gewonnen, oder die „Nährbouillonkonserve“, die man aber beide zuerst auflösen und dann noch filtrieren muß, bevor man die Sterilisation vornimmt. *Löfflers* Serum (zur Züchtung von Diphtheriebacillen) wird im flüssigen Zustand getrocknet; das Pulver muß dann in Wasser gelöst und so wie die frische Serumbouillonmischung zur Koagulation gebracht und gleichzeitig sterilisiert werden; umkehren läßt sich der Vorgang nicht, da ja durch Hitze geronnenes Eiweiß vollkommen wasserunlöslich bleibt.

Die Trockennährböden können auch in Tablettenform gebracht werden, was die Dosierung erleichtert. Daß man Tabletten vorher mit einem Glasstabe zerdrücken und ebenso wie die pulverförmigen Präparate mit dem zugesetzten Wasserquantum gut umschütteln muß, daß man dem Aufkochen mit Wasser eine Zeit der Quellung vorangehen

lassen soll, daß man das Aufkochen nicht über der offenen Flamme, sondern im Wasserbade vorzunehmen und das Anbacken des gequollenen Pulvers an die Glaswände durch erneutes Schütteln oder Umrühren mit einem abgeflammt Glasstabe zu verhüten hat, sind Vorschriften, die für jeden, der mit organischen Substanzen und namentlich mit Kolloiden einmal manipuliert hat, überflüssig sein sollten.

Auf ihre Brauchbarkeit wurden diese Trockennährböden von *Beintker*, *Galli-Valerio* und *Schiffmann*, *Ruß*, *Morgenroth*, *Berge*, *Schaub* u. a. nachgeprüft und als völlig gleichwertig mit den frischen, in gut betriebenen Laboratorien hergestellten Kultursubstraten analoger Zusammensetzung befunden. Auf Nähragar, aus Trockennährböden bereitet, und auf gewöhnlichem Nähragar wuchsen Typhus-, Paratyphus-, Koli-, Anthrax- und Rotzbacillen, ferner Staphylo- und Streptokokken gleich rasch und gleich üppig und zeigten die gleiche Agglutinabilität; auf einer durch Mischen von Konservenagar mit Blut hergestellten Platte entwickelten Streptokokkenkolonien breite hämolytische Höfe und Zusatz von 5% Ascitesflüssigkeit zum aufgelösten Trockennährboden gab eine Kulturfläche, auf welcher Meningokokken vorzüglich gediehen. Ebenso bewährte sich die durch Trocknen konservierte Nährgelatine bei Keimzählungen in Wasserproben, *Endo*-Agar und *Drigalskischer* Lackmus-Krystallviolettagar bei Stuhlluntersuchungen, Neutralrotagar und Lackmusnutroseagar (mit nachträglichem Zusatz verschiedener Kohlenhydrate) bei der Identifizierung von Bakterien der Typhus-Koli-gruppe auf Grund ihrer fermentierenden Eigenschaften (*Beintker*). *Galli-Valerio* und *Schiffmann* bestätigten diese günstigen Ergebnisse für die Kultur des Choleravibrio auf dem konservierten *Dieudonné*schen Blutalkaliagar und *Morgenroth* faßte sein Urteil über die Trockennährböden dahin zusammen, „daß sie nicht minder gut und zuverlässig sind, als die im Laboratorium mit Sorgfalt frisch bereiteten Kulturmedien.“ Die Reaktionen der Typhus-, Paratyphus-, Dysenterie- und Kolikulturen auf den differentialdiagnostischen Trockennährböden bezeichnet *Morgenroth* als absolut charakteristisch.

Im größten Umfange erfolgte dann die praktische Erprobung der Trockennährböden während des Weltkrieges in der österreichisch-ungarischen Armee, deren mobile bakteriologische Feldlaboratorien auf die Verwendung gebrauchsfertiger Nährböden eingestellt waren (Modelle von *Doerr* und von *Doerr* und *Winter*). Da das Gewicht der Trockennährböden nur $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{15}$ der feuchten Maße betrug, wurde es möglich, auf einem ganz kleinen Raum 15—20 und mehr Liter Nährboden unterzubringen, wobei natürlich auch der Wegfall einer bruchsicheren Verpackung raumsparend wirkte und den Transport von Ballast auf Null reduzierte. Für den Ersatz der verbrauchten Trockennährböden wurde gesorgt, aber nicht ausgiebig genug, da der Konsum zeitweise die Produktion überstieg; der temporäre Mangel an Trockennährböden, vornehmlich aber der Übergang zum Stellungskrieg veranlaßte später die

großen zentralen Laboratorien der Etappe, sich doch auch wieder für die Nährbodenbereitung einzurichten, was insoferne natürlich erscheint, als diese Formationen hinsichtlich des Umfanges ihres Betriebes, hinsichtlich ihrer Hilfsmittel und ihrer Schwerbeweglichkeit den großen Untersuchungsanstalten des Hinterlandes glichen und nicht mehr die Verhältnisse darboten, für welche die Nährbodenkonserve die einzig denkbare Lösung darstellte.

Wie vorauszusehen war, wurde der den Trockennährböden zugrundeliegende Gedanke von anderen Autoren aufgegriffen und die Darstellungsart der Nährbodenkonserven mehrfach variiert.

1. *Marx* ging von dem Vorschlage von *C. Hart* aus, an Stelle von Fleischwasser eine Lösung von 10 g gekörnter Fleischbrühe (wie sie von Maggi in den Handel gebracht wird) in 1 l Wasser zu benutzen. Da sich dieser Ersatz als zweckmäßig erwies, ließ *Marx* durch die Firma Merck in Darmstadt ein staubfeines Pulver erzeugen, welches außer der gekörnten Maggibouillon Agar und Pepton enthielt: 42 g des Pulvers, dessen genauere Darstellung nicht angegeben wird und welches die Bezeichnung „Ragitagar“ führt, liefern mit 1 l Wasser eine Stunde im Dampftopf gekocht, einen Nährboden, welcher nach Filtration durch ein Faltenfilter die Eigenschaften eines 2%igen Nähragars zeigt. *Marx* gibt an, daß der aufgelöste Ragitagar ungewöhnlich schnell durch bestimmte Papiersorten (Faltenfilter von Schleicher und Schüll Nr. 588 oder Nr. 597) hindurchgehe, meint aber doch, man könne die Filtration durch Einstellen in einen Dampftopf beschleunigen.

Die „Ragitbouillon“ ist offenbar nichts anderes als ein einfaches Gemenge von Maggis gekörnter Fleischbrühe mit Pepton (vgl. hierzu auch *Hirschbruch* und *Diehl* sowie *Feiler*); sie gibt in der Menge von 22 g in 1 l Wasser gelöst eine schwach alkalische, 1% Pepton enthaltende Nährbouillon.

Um die verschiedenen Spezialnährböden in die Form einer Trockenkonserve zu bringen, geht *Marx* so vor, daß er zu 100 cm³ lackmusneutralen Nähragars, der nach Belieben aus Ragitagar oder auf die übliche Art dargestellt sein kann, eine „Ragit-Endo-Tablette“ oder eine „Ragit-Drigalski-Tablette“ zusetzen läßt. Diese Tabletten enthalten dann jene Zusätze, welche die besondere Reaktivität des betreffenden Spezialnährbodens bedingen. So besteht die Endo-Tablette aus den entsprechenden Mengen von Milchzucker, Natriumsulfit, Soda und Fuchsin; die Zusammensetzung der Drigalski-Tabletten wird als Fabriksgeheimnis behandelt und nur bemerkt, daß sie anstatt der schwer beschaffbaren Nutrose ein vollwertiges Ersatzpräparat enthalten, welches dieselbe wachstumbefördernde Wirkung und die gleiche eigentümliche Gerinnbarkeit besitzt, und daß auch die Lackmuslösung durch einen festen tablettierbaren Farbstoff substituiert wurde (*Marx* und *Eichholz*).

Die Verwendung des neutralen Nähragars als Grundlage und die Umwandlung desselben durch nachträglich zugesetzte pulverförmige

oder tablettierte Substanzen (Zuckerarten, Farbstoffe u. s. w.) in Spezialnährböden ist zuerst von *Marx* angewendet und später auch von anderer Seite adoptiert worden. Wenn sich solche Stoffe glatt und klar lösen und mit den Bestandteilen des Agars nicht reagieren (was z. B. für Soda nicht zutrifft), erscheint dieser Vorgang zweckmäßig, weil man dadurch chemische Alterationen der Zusatzstoffe durch oftmaliges Sterilisieren umgeht. Bei der Bereitung der zuckerhaltigen Medien (*Drigalski-Agar*, *Barsiekow-Flüssigkeiten*) hat man seit jeher einen analogen Modus der Herstellung in zwei Phasen eingehalten.

Schließlich vertreibt die Firma Merck zufolge der Angabe von *Marx* und *Eichholz* auch „Ragit-Barsiekow-Tabletten“ und „Ragit-Zuckertabletten für *Barsiekow-Nährböden*“; die ersteren enthalten die allen *Barsiekowschen* Flüssigkeiten gemeinsame Grundlage und zwar in jeder Tablette für 100 cm³, die letzteren das spezielle, den Bakterien darzubietende Kohlenhydrat (Milchzucker, Traubenzucker, Mannit, Maltose, Saccharose) für 50 cm³ fertigen Nährbodens. In 100 cm³ Wasser sind also 1 Tablette der ersten und 2 der zweiten Art zu lösen; hierauf wird in Röhrchen verfüllt und an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je eine halbe Stunde lang sterilisiert.

Die praktischen Erprobungen der „Ragit-Präparate“ ergaben gleichfalls ein sehr zufriedenstellendes Resultat (*Sparmberg* und *Amako*, *Müller*, *Poppe*, *Richter*, *Feiler*). *Sparmberg* und *Amako* benutzten Ragitagar auch zur Herstellung von Malachitgrünagar und von *Dieudonné'schem* Blutalkaliagar, Ragitbouillon zur Erzeugung von *Löffler'schem* Serum.

2. Ein ähnliches Verfahren empfahl *Piorkowski*. Er benutzt als Material für die drei gebräuchlichsten Nährböden folgende Pulver:

a) für Bouillon:

Pepton. sicc.	10·0 g
Natr. carbonic.	0·025 „
Maggiwürfel (3 Stück)	12·0 „
	<hr/> 22·025 g

b) für Nähragar:

Agar-Agarpulver	20·0 g
Pepton. sicc.	10·0 „
Natr. carbonic.	0·05 „
Maggiwürfel (3 Stück)	12·0 „
	<hr/> 42·05 g

c) für Gelatine:

Gelatine	100·0 g
Pepton. sicc.	10·0 „
Natr. carbonic.	0·05 „
Maggiwürfel (3 Stück)	12·0 „
	<hr/> 122·05 g

Für Choleranährböden hat der Maggiwürfelzusatz zu entfallen, da die Vibrionen dann besser wachsen. Spezialnährböden erfordern entsprechende Zusätze. Zum Gebrauche sind die Pulver, die sich jeder nach

den mitgeteilten Vorschriften selbst anfertigen kann, in den angegebenen Mengen (z. B. für Bouillon 22.025 g, für Nähragar 42 g) in 1 l Wasser aufzuschwemmen und (nach erfolgter Quellung des Agars) eine Stunde lang im kochenden Wasserbade zu halten; dann müssen die Nährböden filtriert, abgefüllt und sterilisiert werden nach den für die Nährbodenbereitung geltenden allgemeinen Normen.

Die Konservierung der Nährböden beruht somit sowohl bei *Doerr* wie bei *Marx* und *Piorkowski* auf der Wasserarmut der Präparate; daher weisen auch alle Nährbodenkonserven dieser Kategorie gemeinsame Vorzüge auf wie das geringe Gewicht und Volumen, die lange Haltbarkeit, die leichte Verpackbarkeit und Transportabilität, die Möglichkeit, beliebig kleine Mengen gebrauchsfertig zu machen. Eine Differenz besteht aber insofern, als *Doerr* den bereits filtrierten, auf die entsprechende Reaktion gebrachten, sterilisierten Nährboden wasserfrei macht, so daß nur eine einzige Manipulation vor der Benutzung (Bakterienaussaat) erforderlich ist: die Wiederauflösung verbunden mit Erhitzung; die feuchten, aus dem Pulver gewonnenen Nährsubstrate, speziell auch Nähragar, *Endo-Agar*, Gelatine sind ohneweiters absolut klar, eine Eigenschaft, die *Beintker* mit Recht als einen besonderen Vorzug hervorhebt. Bei der üblichen Methode der Darstellung der erstarrenden Nährmedien und namentlich bei der Bereitung der verschiedenen Sorten von Nähragar ist ja gerade die zur Klärung notwendige Filtration die umständlichste und zeitraubendste Prozedur; deswegen suchte ich diese Phase vor allem zu eliminieren, um den Bedingungen mobiler Laboratorien gerecht zu werden, und fand die Lösung in der Trocknung der bereits filtrierten Nährsubstrate. *Marx* und *Piorkowski* mengen dagegen die in den verschiedenen Nährböden enthaltenen, von vornherein pulverigen oder pulverisierbaren Stoffe miteinander, wobei sie die besonderen Bestandteile der Fleischbrühe durch die käuflichen Fleischextrakte substituieren; löst man dann die Pulvergemische in Wasser, so erscheinen die kolloidalen Lösungen und die beim Erkalten aus ihnen entstehenden Gallerten trübe, weil die Stoffe entweder an sich unlösliche Beimengungen führen oder miteinander unter Ausflockung unlöslicher Verbindungen reagieren. Die heißen, gelösten Nährböden müssen daher filtriert werden, wodurch zwei der wesentlichsten Vorteile der *Doerr*-schen Trockennährböden verloren gehen: die Möglichkeit der sofortigen Verwendung und der Ausfall der Filtration bei hoher Temperatur, welche Apparate, Heizgas u. s. w. benötigt.

Gegen die Trockennährböden wurde mehrfach eingewendet, daß sie einen zu weichen Plattenagar liefern, wodurch das Ausstreichen des Untersuchungsmateriales ohne Verletzung der Agaroberfläche erschwert wird (*Uhlenhuth* und *Messerschmidt*, *Feiler*), ferner, daß sie zu teuer seien. Was den ersten Punkt anlangt, handelt es sich entweder um eine zu niedrig gewählte Agarkonzentration, also um einen leicht zu vermeidenden Fabrikationsfehler, welcher nicht der Methode, sondern ihrer

Anwendung zur Last gelegt werden muß, oder um die Außerachtlassung der Vorschrift, daß Agarpulver erst ordentlich quellen müssen, bevor man sie durch Aufkochen löst (*Müller*). Systematische Untersuchungen über Agar-Agar als Kolloid wären namentlich mit Rücksicht auf den Einfluß der Quellung sehr erwünscht. Was den Preis betrifft, versteht es sich von selbst, daß die Konserve unter allen Umständen mehr kosten muß als das entsprechende nicht konservierte Substrat. Aber so groß, wie dies meist dargestellt wird, sind die Differenzen nicht und die Beanständungen übermäßiger Preise rühren meist daher, daß die Laboratorien bei der Selbsterzeugung von Nährböden nur die direkten, die Institutskredite belastenden Barauslagen berechnen, die Ausgaben für Arbeitskräfte, Heizgas, Wasser, welche andere Etats betreffen, jedoch einfach vernachlässigen.

Ein anderes Prinzip der Konservierung haben *Uhlenhuth* und *Messerschmidt* verwendet, indem sie die fertigen Nährböden so wie Gemüse- oder Fleischkonserven in verlöteten Blechbüchsen einschlossen. Diese früher von der Elsässischen Konservenfabrik Ungemach, A.-G. in Schiltigheim bei Straßburg, jetzt von den *Behring-Werken* in Marburg (Lahn), hergestellten Büchsennährböden sind sofort gebrauchsfähig; will man z. B. Agarplatten gießen, so werden die Büchsen für 20—30 Minuten im Dampftopf oder im kochenden Wasser gehalten, dann mit einem Büchsenöffner, dessen Schneide vorher durch Abflammen sterilisiert wurde, aufgeschnitten und der verflüssigte Inhalt direkt in sterile Petrischalen entleert. Die Prüfung der Büchsennährböden durch *Hirschbruch* und *Levy* sowie durch *Dold* fiel sehr befriedigend* aus, da offenbar die Metalle, aus welchen die Büchsenwand und die Lötstellen bestehen, keine störenden Mengen oligodynamisch wirkender Stoffe an den Inhalt abgeben, auch wenn die Büchsen längere Zeit (*Uhlenhuth* und *Messerschmidt* sowie *Dold* prüften mehrere drei bis vier Monate alte Proben) gelagert hatten.

Dargestellt wurden in dieser Form: a) festweiche Medien wie Nährgelatine, Nähragar, Spezialnährböden nach *Endo*, v. *Drigalski*, *Esch*, *Dieudonné*; b) flüssige Substrate wie Galle, Bouillon, Peptonglycerin-galle, Peptonwasser, fraktioniert sterilisierte Gemische von Traubenzuckerbouillon und Hammelserum (zur Bereitung von *Löffler-Serum*). Malachitgrünagar wird in der Weise geliefert, daß sich der Nährboden ohne Farbstoff in Büchsen befindet; zu je 600 cm³ verflüssigten Büchseninhaltes ist dann der Inhalt einer besonderen Ampulle Malachitgrünlösung zuzufügen und für innige Vermischung des Farbstoffes mit dem Agarsol zu sorgen.

* Eine Ausnahme bildete nur die Büchsen-gelatine, die in einer von *Dold* untersuchten Probe ihr Erstarrungsvermögen eingebüßt hatte, wie *Dold* meint, wegen oftmaliger und länger dauernden Einwirkung von 30—40°, Temperaturen, denen diese Probe bei ihrer Versendung in die Tropen ausgesetzt war. Büchsen-gelatine würde sich daher nach *Dold* nur zur Verschickung in kältere Gegenden oder zum Transporte während der kühlen Jahreszeit eignen.

Die Büchsen Nährböden waren im Jahre 1915 um 40—60% billiger als die damals im Handel erhältlichen Trockennährböden. Sie sind letzteren insofern überlegen, als sie sogar die Prozeduren des Anrührens mit Wasser, des Quellenlassens der Pulver und ihrer schließlichen Auflösung ersparen; ferner sind sie sicher steril, während in die Pulver doch ausnahmsweise einmal resistente Sporen kommen könnten, die sich dann durch das einstündige Erhitzen im Wasserbad nicht abtöten lassen, obwohl derartige Vorkommnisse nicht zu meiner Kenntnis gelangt sind. Die Büchsen lassen sich auch leicht verpacken und transportieren, doch muß der gesamte Wassergehalt, der schließlich nur Ballast darstellt, mitgeschleppt werden. Über die Haltbarkeit der Büchsen Nährböden wären weitere Mitteilungen erwünscht, ebenso auch exakte Untersuchungen über die eventuelle Abgabe oligodynamischer Stoffe seitens der Büchsenwandungen.

Das Konservieren der Nährböden im feuchten Zustande gestattet endlich, da spontane Zersetzungen anscheinend nicht vorsichgehen, die Versorgung zahlreicher Laboratorien mit Nährböden von sehr einheitlicher Beschaffenheit, was im Kriege, bei ausgedehnten Epidemien u. s. w. von Wichtigkeit werden kann, weil die an verschiedenen Stellen erzielten kulturellen Resultate durch Standardisierung der Kulturmedien an Verlässlichkeit und Vergleichswert gewinnen. Bei Trockennährböden ist das nicht in gleichem Maße der Fall, weil Abweichungen bei der Herstellung der feuchten Substrate stets vorkommen können (ungenau Abmessungen des Lösungsmittels, Gewichtsverluste der leicht zerbröckelnden Tabletten, Verwendung von verschiedenem Wasser, falls [wie im Felde] destilliertes Wasser nicht zur Verfügung steht).

In der ausländischen Literatur von Mitte 1914 bis auf die Gegenwart vermochte ich keine wissenschaftlichen Publikationen über Nährbodenkonservierung aufzufinden. Es scheint sich nur die Industrie der Frage bemächtigt zu haben, da die „Digestive Ferments Co.“ in Detroit, Michigan, U. S. A. seit dem März 1918 „neue“ entwässerte Nährböden („dehydrated culture media“) in den Handel bringt. Die Firma, welche die nötigen Aufschlüsse über ihre Präparate in einer zwanglosen Folge von Broschüren („Difco Scientific Bulletins“) veröffentlicht, teilt mit (in Nr. 22 und Nr. 42 dieser Druckschriften), daß sie ganz besondere Sorgfalt darauf verwendet, den bakteriologischen Laboratorien stets gleich zusammengesetzte, streng nach bestimmten Standardvorschriften bereitete Nährböden zu liefern, welche trockene Pulver darstellen, die nach Ersatz der fehlenden Feuchtigkeit durch destilliertes Wasser sofort gebrauchsfertige Kulturmedien geben. Nach erfolgter Lösung und anschließender Sterilisation erhält man vollkommen klare Nährmedien. Aus den genauen Gebrauchsanweisungen sowie aus der Untersuchung von Proben, die ich mir aus Detroit kommen ließ, geht hervor, daß es sich einfach um die Anwendung des

von mir vorgeschlagenen und 1909 veröffentlichten Verfahren handelt, wobei allerdings mein Anspruch auf wissenschaftliche Priorität nicht beachtet wurde. Die amerikanischen Präparate sind, nach den mir vorliegenden Mustern zu urteilen, weit vollkommener als die Trockennährböden, die man nach meinen Angaben in Europa erzeugt hat. Vor allem wird bei ihrer Fabrikation auf eine richtige H-Ionenkonzentration Bedacht genommen, welche ja bekanntlich für das Bakterienwachstum und für die biologischen Eigenschaften der Mikroben von weit größerer Bedeutung ist als man früher annahm. Die „dehydrated culture media“ sind nicht „lackmusneutral“ oder „schwach alkalisch“, sondern so eingestellt, daß sie nach der Auflösung in bestimmten Mengen destillierten Wassers und nach der Sterilisation Medien von ganz bestimmter Wasserstoffzahl liefern.

Der „Bacto-Nähragar“ („Bacto nutrient agar, dehydrated“) gibt z. B. in der Menge von 18 g in 1000 cm³ destillierten Wassers durch Kochen oder Erhitzen im Autoklaven aufgelöst, ein Substrat, dessen $p_H = \pm 6.5$ beträgt. Der *Endo*-Agar, gewonnen durch Auflösung von 55.5 g Trockenpulver in 1000 cm³ destillierten Wassers, hat eine $p_H = \pm 7.0$.

Darin liegt zweifellos ein entschiedener Fortschritt. Im Kriege, auf Expeditionen u. s. w. steht freilich nicht immer destilliertes Wasser zur Verfügung und die Auflösung in beliebigem Wasser liefert selbstverständlich nicht die Wasserstoffionen-Konzentrationen, auf welche der betreffende Trockennährboden eingestellt ist. Wo destilliertes Wasser beschafft werden kann, ermöglichen jedoch Nährböden von richtig gewählter und bekannter p_H feinere Untersuchungen und ersparen manchen Mißerfolg bei Züchtungen empfindlicherer Bakterien. Daß die „Digestive Ferments Co.“ von den verschiedenen bekannten Methoden der Trocken- und Konservennährböden die von mir seinerzeit empfohlene und ausgearbeitete als Grundlage für die Erzeugung ihrer anscheinend sehr vollkommenen Präparate gewählt hat, darf vielleicht als Beweis dafür gelten, daß dieses Verfahren hinsichtlich der einfachen Verwendbarkeit der Produkte und der fabriksmäßigen Darstellung derselben Vorzüge besitzt und daß sich mit demselben den gewöhnlichen Nährböden absolut ebenbürtige Kulturmedien im großen herstellen lassen. Auf den Preislisten der „Digestive Ferments Co. (Difco)“ figurieren:

Nährbouillon,	} entwässert	Neutralrotmedium,
Nähragar, 1% und 1.5%,		Lactose-Pepton-Galle,
Nährgelatine,		Löfflers Serum,
Zuckerbouillon,		Stärke-Agar,
Lactosebouillon,		Krumwiedes Dreizuckeragar,
Endo-Agar,		Russels Zweizuckeragar etc.
Lackmus-Lactose-Agar,		
Lackmusalb,		

Im allgemeinen befindet sich das Problem der Nährbodenkonserve noch in den ersten Anfängen seiner Entwicklung. Die bisherigen Arbeiten

über das Thema konnten die Fortschritte der Kolloidchemie noch nicht genügend würdigen. Sie kamen auch in einer Zeit zustande, in welcher die Nährbodenküche noch sehr primitiv betrieben wurde und auf die Theorie der Wasserstoffionenkonzentration, auf die Pufferwirkungen der Salze, auf die modernen Bestimmungsmethoden der p_{H} -Zahl, auf neuere Kenntnisse über Eiweißchemie und den Stoffwechsel der Mikroben keine Rücksicht nahm; in dieser Hinsicht hat erst in den letzten Jahren besonders in den großen bakteriologischen Laboratorien Englands und Amerikas eine Reform eingesetzt, die allerdings vorläufig auch nicht mehr als einen Ansatz bedeutet, aber einen verheißungsvollen Ansatz, an die Stelle überlieferter empirischer „Rezepte“ Vorschriften treten zu lassen, die auf die Biochemie der Mikroorganismen basiert sind. Diese Bewegung wird sich auch notwendigerweise auf die Nährbodenkonserve übertragen und letzterer den Anwendungsbereich sichern, den sie als praktische Neuerung verdient.

Mit der Nährbodenkonservierung oder doch mit der Erhöhung der Transportabilität fertiger Nährböden hängen auch die fabrikmäßige Nährbodenerzeugung in zentralen Betrieben und die Standardisierung der Nährböden zusammen. Die Vorteile der letzteren brauchen nicht auseinanderzusetzen zu werden. Daß aber die wissenschaftliche und untersuchungsamtliche Tätigkeit kleiner und großer Laboratorien enorm gefördert würde, wenn sie sich ihre Nährböden nicht mehr in eigener Regie herstellen müßten, liegt auf der Hand; bei richtiger Organisation kann sich dadurch auch finanziell nur eine Ersparnis ergeben. In die wissenschaftlichen Laboratorien paßt strenge genommen die Nährbodenküche nicht; Sache der Wissenschaft ist es nur, die Züchtungsmethoden und Kultursubstrate stetig zu vervollkommen, eine Aufgabe, für welche manches Laboratorium keine Zeit erübrigt, da seine Hilfsmittel durch handwerksmäßige Arbeit zu stark in Anspruch genommen sind.

Literatur: *Beintker*, Zbl. f. Bakt. 1914, I. Abt., Orig. LXXIV, S. 499. — *Berge*, D. tierärztl. Woch. 1914, XXII, S. 587. — *R. Doerr*, Wr. med. Woch. 1909, Nr. 18; XVI^e Congrès international de Médecine, Section XX. Budapest 1910, S. 266. — *Dold*, Deutsche medizinische Wochenschrift 1916, Nr. 1, S. 12. — *Feiler*, Berliner tierärztliche Wochenschrift 1915, S. 767. — *Galli-Valerio* u. *S. Schiffmann*, Zbl. f. Bakt. 1914, I. Abt., Orig. LXXIV, S. 653. — *C. Hart*, Zbl. f. Bakt. 1909, I. Abt., Orig. L. — *Heller*, Berl. tierärztl. Woch. 1914, Nr. 12. — *Hirschbruch* u. *Diehl*, D. med. Woch. 1915, S. 607. — *Hirschbruch* u. *Levy*, ebenda, S. 552. — *Marx*, Zbl. f. Bakt. 1913, I. Abt., Orig. LXXII, H. 3; M. med. Woch. 1910, Nr. 7. — *Marx* u. *Eichholz*, M. med. Woch. 1920, S. 933. — *Mikrokosmos* 1914, S. 281. — *Milchwirtschaftl. Zbl.* Juli 1914. — *Molkerei-Zeitung* 1914, Nr. 28, S. 527. — *J. Morgenroth*, M. med. Woch. 1914, S. 2355. — *Müller*, Diss. Leipzig 1911. — *Pharmaz. Ztg.* 1914, Nr. 27, S. 267. — *Piorowski*, Berl. kl. Woch. 1914, S. 1631. — *Poppe*, Berl. tierärztl. Woch. 1911, Nr. 33. — *Richter*, Diss. Lausanne 1913. — *Schaub*, Hamburger med. Überseeh. 1914, S. 183; Zt. f. öff. Chem. 1914, XX, S. 247. — *Sparmberg* u. *Amako*, Zbl. f. Bakt. 1910, I. Abt., Orig. LVI, S. 94. — *Uhlenhuth* u. *Messerschmidt*, D. med. Woch. 1915, S. 279. — *Zeeb*, D. Schlacht- u. Viehhof-Zeitung 1914, XIV, Nr. 16.

Allgemeines über die Ernährung und Züchtung der Mikroorganismen*.

Von Dr. E. Ungermann †, Berlin.

Die Züchtung der Krankheitserreger unter künstlichen Kulturbedingungen steht recht eigentlich im Mittelpunkte der medizinischen Mikrobiologie. Die Möglichkeit, einen pathogenen Keim im Reagensglase zu kultivieren, macht ihn erst der Forschung und der praktischen Verwendung rückhaltlos dienstbar, macht ihn zu einem Kulturwesen des Menschen, dessen Erwerb nicht weniger bedeutungsvoll ist als manche frühere Errungenschaften der Kultur. Die mikrobiologische Forschung begann mit Entdeckungen auf dem Gebiete der Bakterienzüchtung, ihrem reißenden Entwicklungsgange wurde durch den schnellen Ausbau der Züchtungstechnik in erster Linie der Weg gebahnt, und die Aufgaben der Zukunft dürften wohl auch auf dem Gebiete der Züchtungsfragen zum wesentlichen Teil ihrer Lösung entgegengeführt werden. Neben dieser praktischen Bedeutung hat das Problem der Züchtung von Mikroorganismen Interesse für die Erforschung und Theorie des organischen Lebens, weil es vermöge der verhältnismäßigen Einfachheit der Fragestellung klare und wichtige Ergebnisse geliefert hat und zu liefern verspricht.

Obwohl zwischen den beiden Gruppen von Krankheitserregern, den parasitischen Pilzen und den pathogenen Protozoen, phylogenetische Zusammenhänge nicht bestehen, sind sie bezüglich der künstlichen Kultivierung als eine einheitliche Gruppe zu betrachten. Der Parasitismus hat bei beiden Arten von Kleinwesen analoge biologische Bedingungen hervorgebracht. Eine solche Ähnlichkeit der Daseinsbedingungen konnte sich bei den pathogenen Arten herausbilden, weil sich das Leben der Pilze wie das der Tiere überhaupt auf einer gleichartigen Grundlage aufbaut, nämlich auf dem Saprophytismus, von dem der Para-

* Der nachstehende Aufsatz ist wohl die letzte Arbeit von *Ungermanns* Hand. Er hat ihn nicht mehr vollenden können, doch ist der vorliegende Teil derart in sich abgeschlossen und abgerundet, daß jede unmittelbare Ergänzung den einfachsten Geboten der Pietät widersprochen hätte. Es wurden daher diejenigen Abschnitte, zu deren Behandlung *Ungermann* nicht mehr gekommen ist, in einem Sonderaufsatz zusammengefaßt (*W. Seiffert*, Methoden der allgemeinen Mikrobiologie).

sitismus nur eine extreme Entwicklungsstufe darstellt. Das Dasein des Tieres und des Pilzes bedarf notwendig der vorherigen Tätigkeit des Pflanzenlebens, das in primärer, produktiver Arbeit, unter Ausnutzung der kosmischen Energiequelle des Lichts, hochmolekulare organische Verbindungen schafft, die die Grundlage für alles weitere Leben abgeben. Der Pilz und das Tier sind sekundäre Anpassungen an den durch die Pflanze erzeugten Stoffvorrat, dessen gespeicherte chemische Energie sie allein als Kraftquelle für ihre Lebensäußerungen zu verwenden vermögen. Beide Gruppen von Lebewesen haben von vornherein von fremder produktiver Arbeit gelebt, und es ist daher wohl kein Zufall, daß sowohl das Tier wie der Pilz niemals zu eigener, selbständig assimilierender Tätigkeit gelangt sind, und daß sich aus diesen Klassen die Gesamtheit der pathogenen Keime entwickelt hat, während eine echte Pflanze den Weg zum Parasitentum, außer in wenigen Fällen bei ihresgleichen, niemals gefunden hat.

In dem Kampfe um den organischen Stoff, in dessen Zeichen das Leben seit dem Auftreten des Tieres und des Pilzes steht, mußten sich nun unter dem Drucke der gewaltigen Konkurrenz und unter der Leitung des Prinzips der Trägheit, des Bestrebens, möglichst große Vorteile bei möglichst geringer Arbeitsleistung zu erringen, Anpassungen in den verschiedensten Richtungen herausbilden. Am einen Ende dieser langen Anpassungsreihe stehen die pathogenen Keime, Arten, deren aggressiver Charakter ihnen die hochwertigen Substanzkomplexe lebender Wesen nutzbar hat werden lassen. Am anderen Ende finden sich Keime von mehr passivem Verhalten, die sich in die kümmerlichsten Verhältnisse hineindrängen ließen und hier mit einem Minimum von organischem Stoff auszukommen gelernt haben, so daß manche von ihnen ein pflanzenartig selbständiges, immer aber auf chemischer Energie fußendes Dasein zu führen vermögen.

Der weite Abstand dieser beiden Anpassungsextreme kennzeichnet die große Mannigfaltigkeit der biologischen Verhältnisse, in denen sich das Leben der Mikroorganismen abspielt. Die Zahl der bisher angewendeten Kulturverfahren ist demgegenüber gering genug. Das bezeugt einerseits die Unvollkommenheit unserer Kulturtechnik; denn noch stehen längst nicht alle Krankheitserreger und Saprophyten unter ihrer Herrschaft. Andererseits muß es aber wohl als vorteilhaft anerkannt werden, daß sich die Kulturtechnik bis jetzt auf eine verhältnismäßig kleine Zahl von Arbeitsmethoden beschränkt hat. Es ist eines ihrer wichtigsten Ziele, möglichst einfache, leicht zu handhabende Verfahren aufzufinden, den geringsten Aufwand zu erproben, bei dem die Keime in künstlicher Kultur noch gedeihen. Und diese Aufgabe erscheint durchaus hoffnungsvoll, wenn man sich der erfolgreichen Versuche erinnert, auch sehr spezialisierte und scheinbar anspruchsvolle Mikroorganismen unter sehr einfachen Lebens- und Kulturbedingungen zum Wachstum zu bringen. Ein einheitliches Universalverfahren der Züchtung von Mikro-

organismen zu finden, erscheint bei der Vielseitigkeit der Anpassungen als ein kaum zu verwirklichendes Ziel. Aber die Reduzierung der Kulturverfahren auf wenige, den verschiedenen biologischen Erregergruppen angepaßte Methoden dürfte wohl zu erreichen sein und ist eine wichtige Aufgabe für die Zukunft.

Zuvor allerdings ist die noch dringendere Aufgabe zu lösen, von der großen Zahl der bisher noch nicht gezüchteten Erreger Kulturen zu gewinnen. Die meisten Keime, die sich gegen die Kultivierung bis jetzt erfolgreich gewehrt haben, sind solche Mikroorganismen, die an ganz bestimmte Verhältnisse besonders genau und eng angepaßt sind, so daß sie nur unter diesen Bedingungen zu leben vermögen. Hier besteht die Aufgabe, den Keimen Kulturverhältnisse zu schaffen, die den Bedingungen ihres natürlichen Vorkommens möglichst entsprechen. Die Lösung dieser Aufgabe ist schwierig, weil es nur unvollkommen gelingt, den durch Lebensvorgänge erzeugten Zustandsänderungen im Medium, denen sich viele Keime besonders innig angepaßt haben, unter Kulturbedingungen Gleichwertiges zu schaffen. Von den zahllosen Bakterien, die den Darm der Tiere bevölkern, sind bis jetzt nur verschwindend wenige gezüchtet worden, ebenso von den Keimen, die in Abwässern, in faulendem Material, im Erdboden zu finden sind. Diese Keime leben größtenteils von Stoffen, die von der Fülle ihrer symbiontischen Genossen als Abbauprodukte des Substrates geliefert werden, sie verbrauchen die wechselseitigen Überbleibsel und sind auf diese besonderen Substanzen eingestellt und angewiesen, die von dem ganzen Konzern von Mikroorganismen in gewisser gesetzmäßiger Regelmäßigkeit, nie im Übermaß und stets erneut, hervorgebracht werden. Ähnliche fließende Stoffbewegungen werden auch im lebenden tierischen Gewebe durch die Tätigkeit der Zellen ausgelöst — und die an diese Umsetzungen besonders speziell angepaßten pathogenen Keime sind unseren Zuchtungsversuchen ja auch vielfach mit negativem Ergebnis unterworfen worden. Oft genug ist die Funktion des Wirtskörpers eine notwendige Bedingung für das Leben mancher Parasiten; sie gehen mit dem Ableben des infizierten Organismus, in einem Komplex chemischer Körper, der ihrem Gedeihen eben noch im höchsten Grade geeignet war, ebenfalls in kurzer Frist zugrunde. Das zeigt, gleichgültig wovon das Ableben der Parasiten auch ausgelöst werden mag, eine so weitgehende Anpassung nicht an den Stoff, sondern an seine Bewegung durch den Lebensprozeß, daß sich künstlichen Kulturverfahren bei diesen Erregern nicht sehr hoffnungsvolle Aussichten aufzutun scheinen.

Nun ist aber bei solchen besonders eng an das Leben im Wirtskörper angepaßten Parasiten für kulturelle Maßnahmen der Umstand von Wichtigkeit, daß sie gelegentlich des Überganges von einem Organismus in einen neuen noch unter ganz anderen, oft wesentlich einfacheren Lebensbedingungen zu bestehen vermögen, die einer Nachahmung im Kulturversuch eher zugänglich sind als die Verhältnisse im Wirtskörper.

Auch ist die Anpassungsfähigkeit solcher Keime naturgemäß größer als die der auf ein einziges biologisches Milieu streng eingestellten Parasiten und Symbionten; sie finden sich leichter in die Kulturbedingungen hinein als Keime mit einseitig entwickelter biologischer Potenz. Ebenso macht ein pathogener Keim, der auch als Saprophyt leben kann, der Züchtung weit weniger Schwierigkeiten als ein obligater Parasit.

Zu der Aufgabe, den Kreis der unserer Züchtungstechnik zugänglichen Mikroorganismen zu erweitern, und der, die Kulturmethode zu vereinfachen, ist in neuerer Zeit die Kultivierung unter möglichster Bewahrung der biologischen Eigenschaften der Keime als wichtiges Ziel der Züchtungstechnik hinzugekommen. Vor allem die Virulenz, aber auch die antigene Reaktionsfähigkeit und viele biologische Merkmale der Keime unterliegen im Kulturzustande leicht und schnell tiefgreifenden Veränderungen, die ihre Verwendbarkeit in praktischer und theoretischer Hinsicht wesentlich beeinträchtigen. Diese Veränderungen sind von der Art des Nährbodens und der Kulturhaltung mit abhängig und daher vermeidbar, obwohl noch in den wenigsten Fällen bekannt ist, auf welchem Wege.

Welches sind nun die Mittel, mit denen die Kulturtechnik die Erfüllung ihrer Aufgaben anstreben kann? Sie sind zweifacher Art. An erster Stelle kommen die Nährstoffe in Betracht, in zweiter Linie die physikalischen Verhältnisse, unter denen sie den Keimen geboten werden. Die Beschaffenheit der Nährstoffe ist für den Kulturerfolg im allgemeinen wichtiger als die Art ihrer Aufbereitung. Die beiden Momente können einander in gewissem Grade ergänzen, indem einfache Nährböden gewissen empfindlichen Keimen unter besonderen Bedingungen noch ein Wachstum gestatten, während es unter anderen Verhältnissen ausbleibt. Umgekehrt kann ein besonders guter Nährboden das Erfordernis einer besonderen komplizierten Kulturhaltung für gewisse Keime entbehrlich machen.

Die Ansprüche der Mikroorganismen an die chemische Beschaffenheit des Nährsubstrates schwanken entsprechend ihrer so außerordentlich verschiedenen Natur in sehr weiten Grenzen. Ganz allgemein läßt sich der Nährstoffbedarf der Mikroorganismen dahin zusammenfassen, daß drei Stoffe oder Stoffgruppen für ihr kulturelles Wachstum erforderlich sind: Wasser, organische Substanz und gewisse Mineralsalze, wozu an vierter Stelle für gewisse Arten noch der freie gasförmige oder gelöste Sauerstoff kommt. Ganz unentbehrlich für die Kultivierung der Mikroorganismen sind die beiden zuerst genannten Stoffe, geringere, wenn auch unumgänglich, so doch vielfach noch ungeklärte Bedeutung haben die Mineralsalze. Der freie Sauerstoff kann von den meisten Keimen unter gewissen Bedingungen entbehrte werden, ist aber der Aktivität vieler Kulturen sehr förderlich.

Daß das Wasser für das Leben der Mikroorganismen von größter Wichtigkeit ist, geht schon daraus hervor, daß es 90—93% des Gesamtgewichtes einer Bakterienkultur ausmacht. Um diesen großen Überschuß

an Wasser in sich aufnehmen und halten zu können, verlangen die Keime ein entsprechendes Überwiegen des Wassers auch in ihren Nährsubstraten. Der Grad des minimalen und optimalen Wassergehaltes der Nährstoffe ist aber bei den verschiedenen Keimen entsprechend ihren Anpassungen an die natürlichen Existenzbedingungen sehr wechselnd. So können Schimmelpilze, daran gewöhnt, auf verhältnismäßig wasserarmem Material zu wachsen, schon auf Stoffgemischen vegetieren, die nicht mehr als 20% Wasser enthalten, während einzelne Bakterienarten zum Wachstum mindestens 60% Wasser verlangen, und die dem Leben im Wasser selbst angepaßten Keime nur bei einem spurweisen Gehalt desselben an Trockensubstanz zu gedeihen vermögen. Im ganzen ist dem Leben der Keime ein über das Optimum hinausgehender Wassergehalt der Nährböden viel zuträglicher als eine Zunahme der Trockensubstanzen. Dabei kommt aber auch die Natur dieser letzteren sehr in Betracht. Der Wasserbedarf der Kleinwesen wird neben dem Erfordernis als Baustoff auch durch die Empfindlichkeit der Keime gegenüber hohen Konzentrationen der Nährstoffe hervorgerufen. Nun wird eine schädlich wirkende Konzentration bei den verschiedenen Körpern verschieden schnell erreicht. Im allgemeinen vertragen die Keime natürliche Stoffe oder Stoffgemische in viel höheren Konzentrationen als chemisch reine Substanzen. Denn gerade gegen einen einseitigen Stoffüberschuß sind die Kleinwesen in hohem Grade empfindlich. So schädigt der Zucker, ein in schwacher Konzentration sehr wertvoller Nährstoff, manche Keime schon bei einem Gehalt von 7—8%, und in ähnlicher Weise wirken lösliche anorganische Salze, die in stärkerer Verdünnung notwendige Bestandteile der Nährböden sind. Dagegen gibt Eiergelb bei einem Gehalt von 50% Trockensubstanz in voller Konzentration noch einen sehr guten Nährboden für Kleinwesen ab, ebenso sind konzentriertes Serum, das Gesamtblut, Preßsäfte der Organe von Tieren trotz ihres verhältnismäßig hohen Gehaltes an gelösten Substanzen sehr geeignete Nährböden, und so bietet auch der gesamte tierische Organismus trotz seines immerhin geringen Wassergehaltes von 65% den pathogenen Keimen ausgezeichnete Entwicklungsbedingungen dar. Der Wassergehalt ist somit eine zwar recht bedeutsame, aber doch nur relative, von der Beschaffenheit des gesamten Kulturgemisches und der Wahlfähigkeit der Kleinwesen abhängige Größe.

Auch die anorganischen Verbindungen spielen bei der Kultivierung der medizinisch wichtigen Mikroorganismen keine irgendwie wichtige Rolle. Durch die Beigabe eines anorganischen Salzes zum Nährboden wird im allgemeinen weder eine besondere Verbesserung desselben bewirkt noch ein anspruchsvoller Keim darauf züchtbar gemacht. Die anorganischen Salze in reiner Form sind ja insbesondere den medizinisch in Betracht kommenden Kleinwesen, aber auch der Mehrzahl der saprophytisch lebenden Keime etwas Fremdes, ihren biologischen Verhältnissen nicht Entsprechendes. Gewiß können auch die Mikroorganismen

beim Aufbau ihrer Körpersubstanz die anorganischen Salze ebenso wenig entbehren wie die anderen Lebewesen, aber sie sind daran gewöhnt, diese Stoffe in gebundener Form, in größeren, mit organischer Substanz vereinigten Komplexen aufzunehmen und zu verarbeiten. Bei Verwendung natürlicher, sei es tierischer, sei es pflanzlicher Gewebe und Säfte als Nährboden ist ein Zusatz von Salzen im allgemeinen unnötig. Nur wenn man bei der Herstellung der Nährböden von mehr oder weniger reinen, auf chemischem Wege gewonnenen Präparaten ausgeht, ist die Beigabe von anorganischen Salzen nicht zu umgehen.

Die Bedeutung der Salze für das Leben der Kleinwesen ist bisher vorwiegend nach der theoretisch interessanten und wichtigen Frage des Minimalbedarfes studiert worden. Als Summe dieser Untersuchungen hat sich ergeben, daß vier Elemente, das Kalium (bzw. das ihm etwa gleichwertige, bei den Vibrionen sogar überlegene Natrium), das Magnesium, der Schwefel und der Phosphor zum Gedeihen der Keime notwendig sind. Das ist von *Raulin* für die Schimmelpilze, von *Proskauer* und *Beck* für den Tuberkelbacillus sichergestellt worden. Ob mit diesen Befunden tatsächlich der Minimalbedarf der Mikroorganismen an anorganischem Stoff gefunden worden ist, erscheint aber noch nicht völlig gewiß. Einige Forscher wollen eine Entwicklung von Keimen in äußerst salzarmen Medien, ja sogar in Flüssigkeiten, die von anorganischen Elementen gänzlich frei waren, beobachtet haben. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß das Eindringen von Spuren von Mineralsalzen aus den Wänden des Kulturgefäßes und mit dem Luftstaub schwer zu vermeiden ist, und daß die Keime durch Wiederverwendung der aus ihren absterbenden Genossen freiwerdenden Verbindungen die für ihr Leben notwendigen Salze zurückgewinnen und so ihr Leben einige Zeit hindurch scheinbar ohne Beihilfe anorganischen Stoffes fortsetzen können.

Daß sich auch engere Beziehungen zwischen Mineralsalzen und Mikroorganismen entwickeln können, zeigen die an das Leben in Wässern von besonders hohem Schwefelsalzgehalt angepaßten Schwefelbakterien, welche sich die in den Schwefelverbindungen gebundene chemische Energie durch Spaltung nutzbar machen können, also diese Salze geradezu als vorwiegenden Nährstoff zu benutzen vermögen. Derartige extreme Anpassungen sind für die Theorie des Lebens der Kleinwesen von Interesse, aber belanglos für die mikrobiologische Kulturtechnik, da diesen analoge Verhältnisse bei den parasitischen und saprophytischen Keimen durchaus vermißt werden.

Gewisse Mineralsalze, besonders die Verbindungen des Eisens und des Mangans, wirken als Reizmittel auf das Bakterienwachstum. Auch sonst befördern Metallsalze in starken Verdünnungen die Vermehrung der Keime, auch wenn sie in stärkerer Konzentration giftig sind. Diese Reizwirkungen sind aber so geringfügig, daß sie in der Praxis der Keimzüchtung bisher keine Verwendung fanden und wohl auch weiterhin nicht finden dürften.

Die eigentliche Kraftquelle für das Leben der meisten Mikroorganismen und aller parasitischen Keime ist die organische Substanz. Die Kleinwesen entnehmen daraus ihren Bedarf an Kohlenstoff und Stickstoff, den beiden wichtigsten Lebenselementen. Nur wenige Keimgruppen, welche die medizinische Mikrobiologie nicht direkt interessieren, gewinnen diese Stoffe aus anderen Quellen, so die Salpeterbakterien, die Nitrit- und Nitratbakterien, die Schwefelbakterien und die Wasserstoffbakterien, die ihren Kohlenstoffbedarf durchweg aus der Kohlensäure der Luft sättigen, u. zw. zum Unterschied von der Pflanze unabhängig von der Wirkung des Lichtes, allein mittels chemischer Energie. Andere Keime, so die mit Pflanzenzellen symbiontisch lebenden Bakterioiden, verwenden als Stickstoffquelle den Luftstickstoff und speichern, in vollkommen N-freien Nährböden wachsend, bedeutende Stickstoffmengen. Aber diese eigenartigen Lebewesen sind extreme Anpassungen im Reiche der Mikroorganismen, die unter den eigentlichen Saprophyten und Infektionserregern keine Analoga besitzen. Die Saprophyten und Krankheitserreger sind in ihrer Ernährung alle auf organische Verbindungen angewiesen.

Die als Nährstoffe wichtigsten Gruppen organischer Verbindungen, die Kohlehydrate und die Eiweißkörper mit ihren Abkömmlingen, sind insofern nicht gleichwertig, als erstere nur als Kohlenstoffquelle, letztere als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zugleich dienen und als solche auch von den meisten Mikroorganismen benutzt werden können. Nur wenige Bakterien können ihren Kohlenstoffbedarf allein aus Kohlehydraten, nicht aus Eiweißkörpern entnehmen. Sehr viel mehr Keimarten und darunter wichtige Krankheitserreger können das Eiweiß nicht entbehren, wohl aber stickstofffreie organische Substanz. Indessen sind Gemische von Eiweiß und Kohlehydraten für das Gedeihen von Saprophyten und Krankheitskeimen am vorteilhaftesten. Jedoch ist dabei zu beachten, daß die stickstofffreien Körper in ihren Umsetzungsprodukten häufiger und frühzeitiger Stoffe liefern, die das Leben der Mikroorganismen schädigen, als Eiweißkörper, daß also ihr günstiger Einfluß auf das Wachstum durch spätere nachteilige Wirkungen beeinträchtigt wird.

Von den stickstofffreien organischen Verbindungen sind die Kohlehydrate und unter diesen die Zuckerarten für die Ernährung von Mikroorganismen besonders geeignet. Am wertvollsten sind von den Zuckerarten die Hexosen, u. zw. steht unter diesen der Traubenzucker an erster Stelle. Dann folgen die Disaccharide, Saccharose, Maltose, Lactose, jedoch wird der letztgenannte, der Milchzucker, nur noch mangelhaft abgebaut. Pentosen und Tetrosen sind weit weniger als Bakteriennährstoffe geeignet. Den Zuckern fast gleichwertig sind die sechswertigen Alkohole, darunter vor allem der Mannit, und ein dreiwertiger Alkohol, das Glycerin, das nicht nur als Kraftquelle, als Betriebsstoff, benutzt wird, sondern auch als wichtiger Baustoff (besonders für die Schaffung der Hüllen des Bakterienleibes) vor allem den mit einer derben Membran-

versehenen Keimen, vielen grampositiven und besonders den säurefesten Arten große Vorteile bietet, ja einigen, wie den Tuberkelbacillen, unumgänglich notwendig ist.

Unter den übrigen stickstofffreien organischen Verbindungen sind bisher keine bekannt geworden, die als Bestandteile der Nährböden einen wirklichen Wert haben. Zwar können eine große Anzahl dieser Stoffe als Nährmittel dienen, aber sie sind anderen Körpern durchweg weit nachstehend. Doch gibt es auch hier spezielle Anpassungen. Am leichtesten können noch organische Säuren verwendet werden, und einige medizinisch gleichgültige Keime, wie die Milchscheimmel und die Kahlhefen, benutzen Milchsäure und Essigsäure in erster Linie als Nährstoffe. Die niederwertigen Alkohole sind als Bakteriennährböden kaum von Wert, doch kann z. B. Äthylalkohol von den Essigbakterien gut ausgenutzt werden. Fette und Fettsäuren dienen nur einigen Schimmelpilzen als Kohlenstoffquelle. Kohlenwasserstoffe werden im allgemeinen überhaupt nicht verwertet, ebenso sind aus der Reihe der aromatischen Verbindungen Bakteriennährstoffe von praktischer Brauchbarkeit nicht gefunden worden. Aber die Möglichkeit einer Ausnutzung durch Mikroorganismen besteht bei vielen Körpern auch dieser Gruppe. So kann sogar Carbonsäure in starker Verdünnung von einigen Keimen als Nährstoff verwendet werden.

Spezielle Anpassungen besonders von parasitären Keimen an stickstofffreie organische Körper sind bisher nur selten beobachtet worden. Das Beispiel des Tuberkelbacillus und des Glycerins zeigt jedoch, daß eine Suche nach solchen Zusammenhängen wertvolle Ergebnisse haben kann. Im allgemeinen aber wird durch N-freie Körper nur eine quantitative, keine qualitative Begünstigung des Wachstums der Mikroorganismen erzielt. Dieser günstige Einfluß beruht wohl zum größten Teil auf der leichten Löslichkeit, dem kleinemolekularen Bau, der Labilität dieser Stoffe und der Fülle der in ihnen gespeicherten Energie. Ihr Kohlenstoffreichtum macht sie zu wichtigen Baustoffen, aber vermöge ihrer starken chemischen Energie und ihrer leichten Abbaufähigkeit sind sie vor allem wichtige Betriebsstoffe, die überall dort wertvolle Dienste leisten, wo es auf die Erzielung fermentativer Leistungen der Keime, auf chemische Umsetzungen, Gärungs- und Spaltungsvorgänge ankommt, für die sie meistens selbst auch das Substrat liefern.

Als einziger Nährstoff für dauerndes Bakterienwachstum reichen auch die am besten und leichtesten verwertbaren Kohlehydrate nicht aus; aber schon geringe Mengen stickstoffhaltiger Substanz machen ihre Lösungen zu vorzüglichen Nährsubstraten für viele und besonders saprophytische Keime. Für pathogene Mikroorganismen ist andererseits ein Zuckerzusatz zum Nährboden eine wertvolle Beigabe, die aber auch gewisse Nachteile mit sich bringt. Diese reaktionsfähigen Körper begünstigen direkt oder indirekt die Entstehung giftig wirkender Substanzen, die dem Leben der Keime ein schnelleres Ende bereiten können,

als es erfolgt wäre, wenn diese Stoffe dem Nährboden ganz gefehlt hätten. Für Massenkulturen, die nur kurze Zeit lebenskräftig zu bleiben brauchen, ist der Zusatz stickstofffreier Substanz zum Nährboden sehr wertvoll, dagegen ist er bei Kulturen, die längere Zeit überleben sollen, weniger empfehlenswert.

Den zum Aufbau ihres Körpereiwisses notwendigen Stickstoff entnehmen die meisten Mikroorganismen unter natürlichen Verhältnissen eiweißartigen Körpern oder deren Abbauprodukten. Nur wenige frei lebende Bakterienarten sind befähigt, ihren Stickstoffbedarf anderweitig zu decken. So vermögen die an Leguminosenwurzeln symbiontisch mit Pflanzenzellen lebenden Knöllchenbakterien den Stickstoff der Luft zu assimilieren. Auf experimentellem Wege, dadurch daß stickstofffreie Nährlösungen der spontanen Infektion ausgesetzt wurden, sind noch andere Bakterien gefunden worden, die unter solchen Bedingungen zu gedeihen vermögen und durch ihre Lebenstätigkeit erhebliche Stickstoffmengen im Substrat ansammeln. Indessen ist diese Ernährungsweise doch eine ganz extreme Anpassungserscheinung im Leben der Bakterien, die bei den eigentlichen Saprophyten und Parasiten nicht beobachtet wurde.

Die Salpeterbakterien benutzen ausschließlich den Stickstoff der salpetrigsauren und Ammoniaksalze zum Aufbau ihrer Leibessubstanz. Auch bei ihnen weicht der innere Haushalt erheblich von dem anderer Kleinwesen ab, da sie den Kohlenstoff der Luftkohlendensäure assimilieren. Aber bezüglich der Deckung des Stickstoffbedarfes zeigen viele andere Mikroorganismen ein ähnliches Verhalten, wenigstens unter Kulturbedingungen. Im Reagensglase vermögen die meisten Bakterien die einfachen Salze der Salpetersäure, des Ammoniaks und auch der salpetrigen Säure als Stickstoffquelle zu verwerten. Von den Ammoniaksalzen eignen sich besonders die der organischen Säuren, vor allen der Milch- und Oxalsäure. Sehr gut werden ferner einige Säureamide verwertet, besonders das Asparagin, ferner die meisten Aminosäuren und einige Amine, wie das Glucosamin und das Cholin. Unter den Harnstoffderivaten gibt es nur wenige für Mikroorganismen verwertbare Substanzen, so den Dimethylharnstoff, die Harnsäure und das Alloxan.

Alle diese einfach gebauten, chemisch wohl charakterisierten Stoffe, obwohl letzten Endes durchweg Bestandteile und Abbauprodukte von Eiweißkomplexen, stehen dem Eiweiß auch in ihrer biologischen Wirksamkeit so fern, daß sie als eiweißfremd bezeichnet werden können, im Gegensatz zu den Albumosen und Peptonen, die sich durch ihren komplizierten Bau und ihre biologische Reaktionsfähigkeit der Gruppe der Eiweißkörper zugehörig kennzeichnen. Daß nun pathogene Keime aus so einfachen Substanzen ihr Eiweiß aufzubauen vermögen, ist ebenso interessant wie praktisch wichtig. Es geht daraus hervor, daß die Bakterien nicht die Eiweißkörper ihres Nährsubstrates in ihrer Leibessubstanz verweben, sondern die Bausteine des Eiweißes; das legt den Schluß nahe, daß nicht das Eiweiß der tierischen Gewebe und Flüssig-

keiten den pathogenen Keimen im Tierkörper ein so üppiges Gedeihen gestattet, sondern die Abbauprodukte des tierischen Haushaltes. In der bakteriologischen Praxis aber gestattet dieser Umstand die Züchtung pathogener Keime in biologisch indifferenten, eiweißfreien Medien, in denen schließlich nur das Eiweiß der darin gezüchteten Erreger und ihre Stoffwechselprodukte enthalten sind, eine für das Studium von Toxinwirkungen und Immunitätsfragen äußerst wichtige Technik. Den ersten dieser eiweißfreien Nährböden hat *Pasteur* aus destilliertem Wasser, Hefeasche und weinsauerm Ammoniak zusammengesetzt, weiterhin schlossen sich daran die von *Cohn*, *Ushinsky*, *Proskauer* und *Beck* empfohlenen eiweißfreien Nährlösungen, bezüglich deren Zusammensetzung auf den speziellen Abschnitt über Nährböden verwiesen werden kann.

Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß auf solchen eiweißfreien Gemischen ein so anspruchsvoller und verhältnismäßig schwer wachsender Keim wie der Tuberkelbacillus üppig zu gedeihen vermag. Im allgemeinen aber sind solche mit einfachen Stickstoffverbindungen hergestellten Kombinationen doch nur ein Notbehelf für bestimmte Zwecke. Ein optimales Wachstum pathogener Keime und ein Gedeihen auch der empfindlichen Krankheitserreger wird nur bei Anwesenheit von Eiweißkörpern oder deren komplizierten, unmittelbaren Abbauprodukten erzielt.

Der Widerspruch, der darin zu liegen scheint, daß einmal den Abbauprodukten der Eiweißkörper die Hauptrolle bei der Ernährung der Keime zugesprochen wird, anderseits aber das Volleiweiß für diesen Zweck wertvoller als die Abbauprodukte genannt wird, löst sich bei Berücksichtigung des Umstandes, daß das native Eiweiß keineswegs eine chemische Einheit darstellt, sondern ein lockeres Gemisch groß- und kleinemolekularer Verbindungen, ein Gemenge labiler, leicht zerfallender Komplexe und ihrer Abbauprodukte, aus dem sich die Kleinwesen das herausuchen können, was sie zum Aufbau ihrer Leibessubstanz gerade brauchen. Und das ist ein sehr bedeutsamer Umstand. Die nativen Eiweißkörper und ihre hochmolekularen, chemisch noch nicht faßbaren Abkömmlinge, bieten der Wahlfähigkeit der Mikroorganismen in bezug auf ihre Baustoffe ein weites Tätigkeitsfeld, während die einfachen Stickstoffverbindungen infolge ihrer chemischen Reinheit einseitige Ernährungsbedingungen geben, denen sich viele pathogene Keime nicht anzupassen vermögen. Für das exakte Wissen ist die Möglichkeit, ein Nährbodenrezept chemisch zu formulieren, eine befriedigende Tatsache. Aber die Mikroorganismen befinden sich in den bunten, der chemischen Definierung noch verschlossenen Stoffgemischen, die das native Eiweiß und seine nächsten Abkömmlinge darstellen, entschieden wohlher.

Welche Eiweißkörper, bzw. Abbauprodukte solcher, für die Herstellung von Nährböden die meisten Vorzüge bieten, ist bei der ungeheuren Zahl dieser Substanzen schwer zu entscheiden. Es bestehen in dieser Hinsicht Verschiedenheiten von Fall zu Fall, zwischen einem

Keim und einem anderen. Besonders wichtig für die Brauchbarkeit eines Eiweißpräparates zu Kulturmedien ist neben dem Fehlen schädigender Beimengungen die leichte Löslichkeit der Substanz. Sie gewährleistet eine gleichmäßige Verteilung im Nährsubstrat und eine gute Diffusion an den Ort des Wachstums der Keime. Daher verwendet man in der Kulturtechnik von den chemisch präparierten Substanzen besonders solche, die den Charakter der Peptone und Albumosen haben. Bei der unübersehbaren Mannigfaltigkeit der in diesen Bezeichnungen zusammengefaßten Körper und der verschiedenen Art der Gewinnung der Präparate ist es erklärlich, daß sich einige mehr für diesen Zweck, andere für jenen besser eignen. So bietet die als Nährstoff Heyden bezeichnete Zubereitung besondere Vorzüge für die Züchtung des Tuberkelbacillus, so soll sich ferner das Pepton Chapoteau für die Kultivierung mancher Keime besser eignen als das Witte-Pepton. Besonderer Wert wird auch den im Laboratorium durch peptolytische Verdauung tierischer Gewebe gewonnenen Eiweißspaltprodukten zugesprochen, wohl mit Recht, u. zw. aus dem Grunde, weil diese frisch gewonnenen Präparate ein sehr reiches Gemisch von Spaltprodukten verschiedenster Art enthalten. Weiterhin haben diese Lösungen noch den Vorzug des Reichtums an labilen Stoffen, während die Fabrikpräparate dieser Art bis zu einer erheblichen Stabilität umgeformt sind. Da die fabrikmäßig hergestellten Präparate von Albumosen und Peptonen gegenwärtig einen enormen Preis erlangt haben, dürfte der Herstellung solcher Stoffe im Laboratorium erhöhte Beachtung zu schenken sein, besonders da Ausgangsmaterial für die Gewinnung dieser wertvollen Substanzen in den Betrieben gelegentlich unbenutzt vorliegt.

Der Wert solcher selbst hergestellten Eiweißpräparate als Nährstoff für Mikroorganismen beruht wohl zum größten Teil auf der reichen Mannigfaltigkeit ihrer Zusammensetzung. In einem bunten Stoffgemisch finden auch anspruchsvolle Keime das ihnen zusagende, während Einseitigkeit der Nährquellen das Gedeihen der Kleinwesen hemmt.

Aus demselben Grunde geben weiterhin wohl auch die natürlichen Eiweißkörper des tierischen Organismus so vorzügliche Nährstoffe für die Bakterien ab. Auch diese Substanzen sind ja niemals einseitig rein im chemischen Sinne, sondern stets aus einer Fülle von vollmolekularen Eiweißstoffen und Eiweißtrümmern zusammengesetzt. Ferner enthalten diese Stoffe noch die als Nährmaterial wertvollen stickstofffreien Substanzen, so besonders gewisse Kohlehydrate und anorganische Salze. Das natürliche tierische Eiweiß stellt also an sich ein vollständiges Nährgemisch von großer Vielseitigkeit dar. Der Zusatz solchen Eiweißes unterstützt demzufolge die Nährkraft anderer Gemische sehr bedeutend. Aber auch bei alleiniger Beigabe zu sonst nährstofffreien Medien genügen schon verhältnismäßig geringe Mengen von tierischem Volleiweiß, besonders von präpariertem Blut, zur Herstellung eines Nährbodens von gutem Nährwert.

Das Blut ist in dieser Beziehung entschieden die wertvollste der dem tierischen Körper entstammenden Eiweißsubstanzen. Es enthält als Träger der Bausteine und Trümmer des Organismus die zum Aufbau des Bakterienkörpers geeigneten Elemente in besonders reicher Menge. Es sind natürlich nicht nur die im Serum einbegriffenen gelösten Bestandteile des Blutes als Nährstoffe von Wichtigkeit; vielmehr liefern auch die zelligen Bestandteile des Gesamtblutes ein sehr brauchbares Nährmaterial, besonders wenn sie durch Lösung aufgeschlossen werden. Das Hämoglobin der roten Blutzellen ist als wertvolles Nähr- und vielleicht auch Reizmittel für viele anspruchsvollere Keime allgemein bekannt. Fast alle empfindlichen Keime gedeihen auf hämoglobinhaltigen Nährböden besser als auf hämoglobinfreien, wenn auch nur wenige auf die Anwesenheit von Blutfarbstoff notwendig angewiesen sind. Warum den zelligen Bestandteilen des Blutes bei der Nährstoffbereitung so wenig Beachtung geschenkt wurde, warum sie vielmehr aus dem zu Nährböden zu verarbeitenden Blut sorgsam ausgeschieden wurden, ist nicht verständlich. Die in den Blutzellen enthaltenen Nährstoffe werden in aufgeschlossenem Zustande besser verwertet, als wenn sie ihre Form, wie in der gewöhnlich benutzten Blutagarplatte, beibehalten. Auch diese Blutplatte ist zwar ein gutes Nährsubstrat und hat ihren großen Wert als biologisches Reagens. Aber als Nährboden wird sie von anderen vom Blut ausgehenden Zubereitungen noch übertroffen. Um die Nährstoffe der Blutzellen zugänglicher zu machen, empfiehlt es sich, das Blut vorher der Autolyse zu unterwerfen, wobei neben dem in Lösung gehenden Hämoglobin noch Abbauprodukte entstehen, die nicht mehr koagulabel und leicht diffusibel sind, daher von den Mikroorganismen besonders gut ausgenutzt werden können.

Daß schon das normale Hämoglobin in der Kochhitze nicht völlig koaguliert, sondern wichtige Bestandteile in Lösung gibt, u. zw. gerade solche, die den hämoglobiphilen Keimen für ihr Wachstum von großem Werte sind, zeigt das von *Levinthal* angegebene Agargemisch, das mit dem Vorzuge völliger Klarheit und Farblosigkeit den eines ausgezeichneten Nährsubstrates für Influenza- und Keuchhustenbakterien vereinigt. Der Gehalt an Blutfarbstoff läßt sich bei diesem Nährboden auf spektroskopischem Wege leicht nachweisen. Der *Levinthalsche* Agar nutzt aber gerade diese für Hämoglobiphile wichtige Quote der Blutkörperchenstoffe aus, die anderen läßt er mit voller Absicht unbenutzt, weil es bei ihm auf einen möglichst klaren Nährboden abgesehen ist.

Kann man auf diesen Vorzug verzichten, so erhält man einen für allgemeine Zwecke noch geeigneteren Nährboden, wenn man das Gesamtblut in gelöstem, autolysiertem Zustande als Nährbodenzusatz verwendet.

Man gewinnt einen für die meisten Zwecke geeigneten, auch für Influenzabacillen, Gonokokken und Meningokokken sehr brauchbaren Blutagar, wenn man Blut irgend einer Tierart — auch das großer Tiere,

von Pferden, Eseln, Hammeln ist gut geeignet — bei der sterilen Entnahme mit Natriumcitrat versetzt, so daß die Gerinnung unterbleibt, dazu etwa ein Drittel der Gesamtmenge steriles Leitungswasser oder auch Fleischbrühe gibt, das Gemisch in Reagensröhrchen zu je 10 cm^3 verteilt und diese am selben sowie an den beiden folgenden Tagen 30 bis 45 Minuten auf 56° erhitzt. Dabei werden die Blutzellen, sofern sie nicht schon vom Wasser aufgelöst wurden, hämolysiert, und es tritt eine Umwandlung des Blutfarbstoffes in Methämoglobin ein, so daß das Gemisch schließlich eine braunschwarze Farbe annimmt und am Boden der Röhrchen einen grauroten Satz fallen läßt. Der Inhalt jedes Röhrchens, zu etwa 90 cm^3 neutralen Agars zugesetzt, ergibt einen ziegel- bis braunroten undurchsichtigen Nährboden, auf dem auch die anspruchsvollsten Bakterien zu üppigem Wachstum gelangen. Ein besonderer Vorzug dieser Blutzubereitung ist seine unbegrenzte Haltbarkeit; man kann sich demzufolge durch eine Blutentnahme auf mehrere Wochen und länger mit einem stets gebrauchsfähigen Bakteriennährboden versehen, der übrigens auch für sich allein zu einfachem Wasseragar zugesetzt noch gute Kulturergebnisse liefert. Bakterielle Verunreinigungen des Blutpräparates, die bei längerer Aufbewahrung auftreten können, sind, sofern es sich nicht um Sporenbildner oder andere sehr resistente Keime handelt, durch fraktionierte Sterilisierung ohne Schaden für den Nährwert des Materials zu beheben.

Der Wert des Blutes als Bakteriennährboden beruht neben seiner natürlich sterilen Beschaffenheit auf seinem Reichtum an gelöstem, bzw. leicht löslichem Eiweiß und dessen Abbauprodukten. Die Eignung der sonstigen Bestandteile des tierischen Organismus als Kulturboden ist von den gleichen Bedingungen abhängig. Die Ausnutzung der sehr beträchtlichen Energie, die in den Geweben gespeichert ist, wird den Kleinwesen durch ihre geformte Bindung in den Zellen wesentlich erschwert. Die Eiweißkörper der Zelle in einer Form in Lösung zu bringen, die sie für die Ernährung von Mikroorganismen brauchbar werden läßt, gelingt nur unter starker Veränderung ihres Baues und wird bei der gewöhnlich geübten Verarbeitung solchen Materials nur in geringem Umfange verwirklicht. Bei der Herstellung der Fleischbrühe, des wichtigsten Substrates der gegenwärtig gebrauchten Nährböden, geht nur ein kleiner Teil der im Muskel gebundenen biochemischen Energie in Lösung, nämlich nur die im Muskel enthaltenen löslichen Abbauprodukte. Diese Stoffe haben zwar für die Ernährung der Keime großen Wert, stellen aber nur einen verschwindenden Teil der Gesamtenergie des verarbeiteten Eiweißes dar, das selbst als Nährboden fast ganz unbenutzt bleibt. Eine rationelle, sparsame Arbeit aber müßte das gesamte Muskelleiweiß in lösliche, leicht diffusible Produkte überführen.

Dem Blut an Ausnutzbarkeit am nächsten kommen einige flüssige Exkrete und Sekrete des Organismus, so vor allem die sterilen Transsudate in den serösen Höhlen, die reich sind an genuinem Eiweiß und

autolytischen Abbauprodukten. Ihr Nährwert steht aber infolge des geringeren Prozentgehaltes an Eiweißkörpern doch wesentlich niedriger als der des Vollblutes und des Serums. Und da sie auch in der Art der Beschaffung schwieriger und auch weniger sicher steril zu erhalten sind als das Blut, so ist ein Grund für ihre bisherige Bevorzugung nicht recht ersichtlich.

Entzündliche Exsudate werden schon wegen ihres Keimgehaltes als Nährböden im allgemeinen nicht verwendet. Man kann sie aber mit Vorteil als Medium für eine langdauernde Aufbewahrung der in ihnen enthaltenen Erreger benutzen, besonders für resistentere Keime, wie Streptokokken, Staphylokokken, die Anaerobier; unter Luftabschluß, z. B. luftfrei in Glas eingeschmolzen, halten sich diese Keime in solchem Material lange Zeit verwendungsfähig. Sterile entzündliche Exsudate, wie nach Aleuronatinjektion im Peritoneum angesammelter Eiter, sind als Bakteriennährböden genuinem tierischen Eiweiß nicht überlegen.

Von den tierischen Exkreten ist zur Kultur von Mikroorganismen in erster Linie die Milch von Wichtigkeit, die ja sämtliche für den tierischen Haushalt und das organische Leben überhaupt notwendigen Stoffe — Eiweißkörper, Kohlehydrate und Salze — in leicht sterilisierbarer Form enthält. Etwas beeinträchtigt wird der Wert der Milch als Nährboden dadurch, daß das Casein weniger leicht abbaubar und verwertbar ist als das eigentliche tierische Eiweiß.

Wichtiger, dem Blute in vielen Beziehungen gleichkommend und es für manche Zwecke sogar übertreffend, sind die Bestandteile des Vogeleies, besonders das Eigelb. Der Grund, weshalb diese Stoffe als Nährboden so wertvoll sind, ist der gleiche wie beim Blute: auch das Ei enthält alle zum Aufbau des tierischen Organismus notwendigen Baustoffe, u. zw. nicht in Zellen gebunden, sondern in gelöster, leicht diffusibler Form und zum großen Teil wohl nicht in voll molekularen Komplexen, sondern in hochwertigen labilen Teilkörpern. Dazu besitzt das Ei eine Menge wertvoller Kohlehydrate und Salze in den zum organischen Aufbau erforderlichen Mengenverhältnissen. Es ist eine gedrängte Zusammenfassung des tierischen Organismus von hoher potentieller Energie, Labilität und dabei natürlicher Sterilität, daher ein idealer Nährboden für die meisten, auch anspruchsvolleren Keime.

Die zelligen Organe und Gewebe des tierischen Körpers können in drei Zubereitungen als Nährböden verwendet werden: als steriles oder sterilisiertes Vollgewebe, als auf kaltem Wege bereiteter steriler oder steril filtrierter Extrakt und als Kochextrakt.

Im ersteren Falle dienen Organstückchen vornehmlich als Zusätze zu anderen Nährböden und bewirken neben physikalisch-chemischen Einflüssen noch biochemische Zustandsänderungen der Nährböden, indem sich in ihnen autolytische Umsetzungen vollziehen, die sich dem gesamten Substrat mitteilen. Das in den Zellen gebundene Eiweiß wird im allgemeinen nur von Bakterien mit hohem peptolytischen Vermögen,

z. B. den anaeroben Keimen angegriffen, für die denn auch Organzellbrei wie der *Hiblersche* Hirnnährboden mit Vorteil verwendet wird.

Extrakte aus frischen Organen werden seltener als Nährstoffe für Mikroorganismen benutzt, obwohl sie wertvolle Nährstoffe enthalten, weil ihre Gewinnung in sterilem Zustande verhältnismäßig schwierig ist und sie im Vergleich mit Blut oder Serum wesentliche Vorzüge nicht besitzen; denn an Abbauprodukten sind diese Extrakte im ganzen ärmer als Blut und Serum. Größeren Wert haben Extrakte aus solchen Organen, in denen sich ein lebhafter Stoffumsatz abspielt, wie in der Placenta oder im embryonalen Gewebe. Native, nicht erhitzte, keimfreie Extrakte solchen Materials sind Blutzubereitungen für manche Zwecke sogar überlegen.

Kochextrakte liefern nur die nicht koagulablen, leicht diffundierenden Extraktivstoffe, die niederen Abbauprodukte der Eiweißkörper zum Nährboden, leicht verwertbare aber schnell erschöpfte Substanzen, die in verschiedenen Materialproben in stark wechselnden Mengen enthalten sind. Das Ergebnis der Extraktion ist daher recht ungleich und infolgedessen ein Schwanken der Güte und Brauchbarkeit unserer gewöhnlichen, vom Muskelkochextrakt ausgehenden Nährböden nicht zu vermeiden.

Wie der tierische Organismus, so enthält auch die Pflanze alle für den Aufbau organischer Substanz notwendigen Stoffe und kann daher den Mikroorganismen in ihren Geweben einen vollständigen Nährboden liefern. In der Tat wachsen vielfach auch tierpathogene Keime auf sterilem pflanzlichen Gewebe sehr üppig. Indessen sind im allgemeinen doch nur wenige Vorratsgewebe in diesem Sinne verwendbar, Gewebe, in denen neben Eiweiß und Fett hauptsächlich Kohlehydrate aufgespeichert sind. Diesen Geweben fehlt vor allem die lebhafteste Stoffbewegung, die bunte Mannigfaltigkeit an Auf- und Abbaukörpern, wie sie den Säften und Geweben des tierischen Haushaltes eigen und als Nährstoffe für Mikroorganismen so wertvoll sind. Die Vorratsstoffe der Pflanze haben einheitlicheren und stabileren Bau, sind den Kleinwesen zudem in der derben Cellulosehülle der Pflanzenzelle schwerer zugänglich als in den zarten Zellverbänden des Tierkörpers. So haben sich denn auch die pflanzlichen Gewebe trotz vielfacher Anwendung zur Züchtung von Mikroorganismen nicht besonders bewährt, sie sind immer mehr außer Gebrauch gekommen, und es ist auch kaum zu erwarten, daß in Zukunft bei ihrer Benutzung ein wesentlicher Fortschritt gemacht werden wird.

Bessere Aussichten auf praktisch wertvolle Ergebnisse bieten die in den letzten Jahren mehrfach unternommenen Versuche, die Leibes-substanz gewisser Mikroorganismen als Nährstoffe für andere Keime zu benutzen. Da die Kleinwesen als vollkommene Organismen alle zum Leben notwendigen Stoffe in sich enthalten müssen, ist die Möglichkeit der Verwendung ihrer Bestandteile zur Ernährung anderer Lebewesen

von vornherein gegeben. Es kommt nur darauf an, ihre Körper in richtiger Weise aufzuschließen, ihr Eiweiß in lösliche Form zu bringen. Bei Keimen, die starke autolytische Fähigkeiten besitzen, ist das auf schonendem Wege möglich. Bei anderen gelingt es durch Zertrümmerung der Bakterienhülle und nachfolgende Extraktion. Ob sich dabei eine rationelle, gewinnbringende Arbeitstechnik wird finden lassen, ob das zur Erzeugung der Nährkultur erforderliche Material dem gewonnenen Nährstoff an Wert entsprechen oder ihm gar überlegen sein wird, müssen weitere Versuche noch ergeben. Dabei ist an die Möglichkeit zu denken, daß neben den unspezifisch als Eiweißbausteine wirkenden Körpern auch Stoffe von spezifischer Nährkraft und Reizwirkung gefunden werden, die bei der Kultivierung dieses oder jenes Keimes mit besonderem Erfolge benutzt werden können. Vielleicht würden sich auf diesem Wege auch elektive Züchtungsverfahren anbahnen lassen.

Daß eine solche elektive Begünstigung gewisser Keime durch das Vorhandensein und Wachstum anderer gelegentlich stattfindet, zeigt besonders deutlich die interessante, praktisch noch kaum ausgenutzte Erscheinung des Ammenkulturwachstums. Als Ammenkolonien bezeichnet man die Kulturen gewisser meist kräftig wachsender Keime, in deren Umgebung anspruchsvolle, schwach wachsende Erreger auf der Kulturplatte entweder überhaupt nur oder jedenfalls erheblich stärker wachsen als auf den übrigen Teilen des Nährbodens. Worauf diese Begünstigung beruht ist unklar. Es ist möglich, daß sie durch die Abscheidung hochwertiger, als Bausteine für den begünstigten Keim besonders wertvoller Stoffwechselprodukte der Ammenkolonie veranlaßt wird. Es kann sich aber auch um Stoffe handeln, die nicht zum Aufbau der Leibessubstanz des begünstigten Keimes verwendet werden, sondern nur einen Anreiz zu stärkerer Lebenstätigkeit und intensiverer Ausnutzung der Nährstoffe des Kultursubstrates ausüben.

Auch von manchen anderen Substanzen, die das Wachstum der Keime verbessern, steht noch nicht fest, ob sie als echte Nährstoffe oder nur als Reizstoffe wirken. Das letztere kann mit einiger Sicherheit nur bei solchen Körpern angenommen werden, die nicht in den inneren Haushalt der Kleinwesen eintreten, wie etwa die Lithiumsalze. Aber der Kreis der Stoffe, die durch ihre Reizwirkung einen günstigen Einfluß auf die Kulturen besitzen, ist viel größer. So bewirken wohl auch viele andere Metallsalze im wesentlichen durch ihren Reiz auf die Keime eine Verbesserung des Wachstums, wenn sie auch in gewissen Mengen mit zum Aufbau der Leibessubstanz benutzt werden können, wie die Mangan- und Eisensalze und andere anorganische Verbindungen. Alle diese Salze hemmen in etwas stärkerer Konzentration das Wachstum der Kulturen, sie wirken dann als Gifte. Der Wachstumsreiz ist als der erste Grad dieses aggressiven Einflusses aufzufassen. Wahrscheinlich wirken diese Stoffe in schwacher Konzentration auf die Bakterienhülle in dem Sinne ein, daß dieselbe plastischer, lockerer bleibt und so dem Zuströmen der

Nährstoffe zum Bakterieninneren sowie der Vergrößerung und Teilung des Keimes geringeren Widerstand entgegengesetzt als gewöhnlich.

Ähnlich den Metallsalzen wirken auch zahlreiche organische Gifte. Auch die durch sie ausgelöste Begünstigung des Wachstums dürfte durch Veränderungen der Hülle erzeugt werden. Dasselbe gilt wohl auch von vielen in den üblichen Nährsubstraten enthaltenen Stoffen, von denen manche Nähr- und Reizwirkungen in sich vereinigen werden, so daß eine strenge Scheidung beider Prinzipien nicht mehr durchführbar ist.

Mancherlei spricht dafür, daß auch das ausschließliche Gedeihen vieler Keime in ihrem natürlichen symbiontischen Verbands oder im lebenden, noch voll funktionierenden Tierkörper auf die Reizwirkung der lebenden Zellen oder Symbionten zurückzuführen ist. Aber es könnte sich in diesen Fällen doch auch um echte Nährstoffe handeln, die jedoch so labil sind, daß sie mit dem Material ihres Ursprungs im Reagensglase nicht gefaßt werden können. Die Nutzbarmachung dieser Körper für die Kulturtechnik ist ein wichtiges Problem für die Zukunft, das vielleicht durch Zuhilfenahme osmotischer Vorgänge der Lösung entgegengeführt werden könnte.

Seiner Wirkung nach gehört auch der Sauerstoff der Luft für viele Mikroorganismen zu den Reizstoffen. Denn seine Gegenwart bedingt eine erhebliche Beschleunigung des Ablaufes aller Lebensvorgänge der Kulturen, obwohl er für das Leben selbst für die meisten Keimarten kein unbedingtes Erfordernis ist.

Der Luftsauerstoff ist für die Kleinwesen ebenso wie für die Pflanze und das Tier in erster Linie Betriebsstoff, dessen Aufnahme, die Atmung im eigentlichen Sinne, mehr der Ausnutzung, dem Abbau der Leibes-substanz, dem Umsatz in Energie, dient als dem Aufbau, der Speicherung von Kraft. Daß es bei manchen Bakterien auch eine alimentäre Atmung gibt, bei der Kohlensäure und Stickstoff aus der Luft aufgenommen und zu Körpersubstanz verarbeitet werden, wurde schon früher erwähnt. Ob auch der aufgenommene Luftsauerstoff teilweise dem Aufbau dient, steht noch dahin. Die Hauptmenge des zum Aufbau des Eiweißes der Mikroorganismen notwendigen Sauerstoffes wird jedenfalls von den sauerstoffhaltigen Verbindungen der Nährsubstrate geliefert; der Luftsauerstoff ist in erster Linie Betriebsstoff, nicht Nährstoff.

Da nun das Leben der meisten Mikroben und besonders der Bakterien nicht so sehr auf ununterbrochen fortdauernden Betrieb eingestellt ist wie das des Tieres und der Pflanze, sondern mehr oder weniger lange Perioden relativen oder fast absoluten Stillstandes verträgt, so ist schon deswegen der Sauerstoff für die Mehrzahl der Keime zur einfachen Erhaltung der Lebensfähigkeit nicht völlig unentbehrlich. Aber auch für den Betrieb des aktiven Lebens hat der Sauerstoff im Reiche der Mikroorganismen nicht die grundlegende Bedeutung, die ihm sonst im organischen Leben zukommt. Unentbehrlich ist er im all-

gemeinen für alle solche Keime, deren innerer Haushalt vorzugsweise auf oxydative Vorgänge eingestellt ist. Bei solchen Mikroorganismen dagegen, deren Leben mehr auf dem Abbau von Eiweißkörpern sich gründet, die also im allgemeinen fäulniserregend wirken, Reduktionsvorgänge als Kraftquelle benutzen, ist die Anwesenheit freien Sauerstoffs weniger wichtig. Schimmelpilze und Hefen, sofern sie nicht besondere Anpassungen erworben haben, entfalten daher nur bei Gegenwart reichlichen Sauerstoffs ein üppiges Wachstum und sind nur unter solchen Bedingungen zu optimalen chemischen Leistungen befähigt, die ja im wesentlichen oxydativer Natur sind. Ähnlich verhalten sich viele andere Keime, besonders saprophytische Luftbakterien; auch die Farbstoff erzeugenden Bakterien brauchen für reichliches Wachstum und die Bildung typischer Kolonien den Luftsauerstoff, wohl auch deswegen, weil die Bakterienfarbstoffe oxydativen Prozessen ihre Entstehung verdanken.

Die Mehrzahl der pathogenen Keime wächst ebenfalls besser bei Gegenwart gasförmigen Sauerstoffs und liefert demzufolge solche Stoffe, bei deren Entstehung die Individuenzahl von Bedeutung ist oder oxydative Vorgänge eine Rolle spielen, erst bei Sauerstoffanwesenheit in ausgiebiger Menge. Der Grund für dieses üppigere Wachstum bei Sauerstoffgegenwart ist wohl in der dadurch bedingten besseren Verarbeitung der Nährstoffe des Substrates zu suchen; aus diesem regeren Lebensbetriebe ergibt sich ein schnelleres Wachstum der einzelnen Keime, eine Beschleunigung der Teilungen und eine rasche Entwicklung üppiger Kulturrasen. Aber die pathogenen Keime sind keineswegs unfähig, Nährstoffe beim Fehlen freien Sauerstoffs zu verwerten, sie sind nicht obligate Aerobier im strengen Sinne. Weitaus die meisten von ihnen können unter gewissen Bedingungen auch unter Luftabschluß längere Zeit hindurch ausreichendes Wachstum entfalten, wenigstens im geeigneten Nährsubstrat. Denn die nachteilige Wirkung des Sauerstoffmangels kann durch die Beschaffenheit des Nährbodens verstärkt oder gemildert werden. In dürrtigem Nährmaterial entfalten diese Keime bei Abwesenheit des Sauerstoffs überhaupt kein Wachstum und gehen unter solchen Bedingungen bald zugrunde. In Nährstoffgemischen, die ihren Bedingungen zusagen, können sie sich dagegen noch gut entwickeln. Auf besondere Schwierigkeit trifft beim Fehlen des Luftsauerstoffs in kargem Nährmaterial der erste Beginn des Wachstums; der Sauerstoff stellt in dieser Hinsicht offenbar einen mächtigen, entwicklungsanregenden Reiz dar, der aber durch andere Reize ersetzt werden kann und entbehrlich ist, wenn sich die Vegetation der Keime erst einmal im Gange befindet.

Als Wachstumsreiz bei fehlendem Sauerstoff ist besonders wertvoll die Labilität der als Nährstoff gebotenen Verbindungen. Denn solche Stoffe können von den Kleinwesen offenbar leichter verarbeitet werden als stabile Körper. Sie erzeugen wohl durch den in ihnen selbsttätig sich auslösenden Zerfall in einfachere Verbindungen jene Stoffbewegung, die sonst der Sauerstoff durch seine oxydativen Wirkungen herbeiführt, und

die dem Gedeihen besonders der pathogenen Keime so zusagt. Daher ist es von Wert für die Kulturhaltung der Kleinwesen, große, biologisch aktive, labile Komplexe als Nährsubstrate zu verwenden; denn starre Körper, deren chemischer Bau meist gut definierbar ist, passen schwieriger in das Gefüge des Mikroorganismus hinein und geben daher spätere und weniger üppige Kulturresultate.

Solche leicht assimilierbaren Nährstoffe sind für die Kultivierung von Kleinwesen in jedem Falle sehr vorteilhaft, gleichgültig unter welchen Bedingungen sie den Keimen geboten werden. Sie bewähren sich auch unter Verhältnissen, die den soeben berührten gegenteilig erscheinen, sie ermöglichen den als Anaerobier bezeichneten Bakterienarten mitunter Wachstum auch bei Zutritt luftförmigen Sauerstoffs. Bekanntlich entfalten Keime, die in gewöhnlichem Agar oder in Fleischbrühe nur bei absoluter Fernhaltung des Sauerstoffs gedeihen, in eiweißreichen flüssigen Medien und sogar an der Oberfläche eines geeigneten Blutagars mitunter ein mehr oder weniger reichliches Wachstum. Diese scheinbare Abweichung von ihrer biologischen Norm kommt bei recht vielen anaeroben Bakterien vor, nur wenige Arten sind wirklich streng anaerob. Auf die Art der Nährstoffe kommt es bei der Kultivierung der Mikroorganismen in erster Linie an, dann erst auf die Bedingungen der Kulturhaltung. Von diesen Bedingungen ist aber die Anaerobiose zweifellos die wichtigste.

Die aerobe und die anaerobe Existenz der Kleinwesen unterscheiden sich letzten Endes wahrscheinlich durch den Chemismus der Verdauungsenzyme. Die Nährstoffe werden von den Keimen wohl nicht direkt zum Aufbau ihrer Leibessubstanz verwendet, sondern vorher in geeignete Bausteine aufgeschlossen. Bei den anaeroben Keimen verlaufen diese Verdauungsvorgänge ohne wesentliche Beteiligung oxydativer Prozesse, sind also im wesentlichen reduktiver Art. Doch ist der Gegensatz zu den aeroben Bakterien kein absoluter, da die Mehrzahl der Aerobier wenigstens latent die Anlage auch des reduktiven Verdauungsmodus in sich trägt, und da anderseits Anaerobier auch oxydierende Wirkungen ausüben können. Der Übergang aus einer Gruppe in die andere ist unter natürlichen Entwicklungsbedingungen wohl oft und leicht eingetreten, wofür das Vorkommen anaerober neben nahe verwandten aeroben Arten in mehreren Formenkreisen der Bakterien spricht. Die Anaerobier sind keine einheitliche und scharf umgrenzte morphologische, vielmehr nur eine biologische Gruppe. Sie bilden, wie die obligaten Aerobier anderseits, einen extrem angepaßten Flügel der Mikroorganismenreihe, in der weitaus den meisten Gliedern die doppelte Fähigkeit zum Abbau unter Beihilfe des Sauerstoffs und ohne diese eigen ist. Den Übergang zu den Anaerobiern bilden Keime, die in einer gewissen niederen Sauerstoffspannung ein optimales Wachstum entfalten, bei freiem Luftzutritt und gänzlichem Abschluß weniger gut gedeihen. Bei diesen Keimen kann von einer Giftwirkung des Sauerstoffs keine

Rede sein. Die Einstellung auf eine bestimmte Sauerstoffmenge spricht vielmehr für enge funktionelle Beziehungen des Gases zu den vegetativen Vorgängen. Denn das Leben dieser und der anaeroben Keime überhaupt bleibt auch in sauerstoffhaltiger Luft bestehen, es tritt nur kein Wachstum, keine Vermehrung, keine Überführung der Nährstoffe in Bakteriensubstanz ein. Die Ursache der Wachstumshemmung der anaeroben Keime durch den Sauerstoff ist also wohl entweder in einer direkten Hemmung der Tätigkeit der Enzyme gesucht worden oder darin, daß die durch die Fermente erzeugten Abbauprodukte vom Sauerstoff sogleich in andere, als Bausteine nicht geeignete Körper übergeführt werden. So ist sie letzten Endes ein Hungerzustand der Keime. Wachstum der Anaerobier kann auch bei Sauerstoffgegenwart erfolgen unter Bedingungen, die seine Aggressivität ablenken oder binden, so in Mischkultur mit aeroben Keimen, deren oxydative Tätigkeit den Sauerstoff verbraucht, so bei Gegenwart fein verteilter geformter Partikelchen oder von Gewebsstücken, die den Sauerstoff mechanisch adsorbieren, oder endlich in nährstoffreichen, stark abgebauten und leicht abzubauenen Substraten, in denen der Sauerstoff durch die Menge der reaktionsfähigen Substanzen abgelenkt wird und in denen die Abbaufemente der Bakterien infolge der Labilität der Komplexe leichte Arbeit haben, vielleicht sogar, im Beginne des Wachstums, gar nicht in Tätigkeit zu treten brauchen, weil schon von vornherein brauchbare Bausteine vorhanden sind. Das sind die Gründe, weswegen hochwertige labile Komplexe auch für die Kultur anaerober Keime große Vorzüge haben.

Die Anaerobiose ist vielleicht die ursprüngliche Daseinsform und der Ausgangspunkt der gesamten Mikrobenvelt. Denn dort, wo sich tote organische Substanz in größerer Menge ansammelt, treten schon unter dem Einfluß der autolytischen, chemischen Zersetzung alsbald anaerobe Verhältnisse ein. Das gilt sowohl für die freie Natur wie für die höheren tierischen Organismen. Der Darmkanal der Tiere, der Hauptsitz der ätiologisch wichtigen Anaerobenarten, wimmelt von Keimen streng anaerober Lebensweise. Im Darm der Tiere herrschen also die strengsten anaeroben Bedingungen, ausgenommen seine obersten Abschnitte. Es muß also jeder vom Darm aus infizierende Keim, auch der unter Kulturverhältnissen sauerstoffliebende *Cholera vibrio*, zu anaerober Existenz befähigt sein. Aber nicht nur im Darm der Tiere, auch in ihren Geweben sind überall die Bedingungen völliger Anaerobiose gegeben. Denn im Gewebe können die strengsten Anaerobier überall gedeihen; die absorbierende Wirkung der Gewebe auf den Sauerstoff ist ja schon bei toten Stückchen *in vitro* sehr erheblich, im lebenden Organismus wird sie um ein Vielfaches stärker in Erscheinung treten und so den Sauerstoff von den Keimen absolut fernhalten. Es werden somit alle in den Geweben parasitierenden Kleinwesen im Grunde unter den ihrem biologischen Charakter am meisten entsprechenden Bedingungen Anaerobier

sein. Im Einklang damit steht die Tatsache, daß aus den vorwiegend aerob lebenden Bakteriengruppen, wie den Sproß- und Fadenpilzen, eine verhältnismäßig kleine Zahl pathogener Arten hervorgegangen ist, bei denen dann vielfach auch schon wieder anaerobe Anpassungen hervortreten.

Dem Wachstum in Abwesenheit von Sauerstoff kommt für das Leben der Kleinwesen eine umfassendere Bedeutung zu als der Aerobiose. Diese hat vielmehr nur durch Vermittlung der üblichen Kulturtechniken den Anschein allgemeinerer Gültigkeit erlangt. Doch sind die Beziehungen der Mikroorganismen zum Sauerstoff im allgemeinen weniger bedeutungsvoll als die Beschaffenheit der Nährsubstrate.

Nächst den Beziehungen zum Luftsauerstoff ist für die Kulturerhaltung der Mikroorganismen die Art des Substrates, in das die Nährstoffe gefaßt werden, das wichtigste Moment. Ohne Zubereitung und Zusätze irgendwelcher Art eignen sich nur wenige Stoffe tierischer Herkunft für kulturelle Zwecke, wie das Blutserum, die Milch. Die meisten anderen, vor allem die chemisch gereinigten Körper, bedürfen der Lösung und Fassung in flüssigen oder festweichen Medien.

Den natürlichen Lebensbedingungen der Kleinwesen kommen gemäß ihrer schon hervorgehobenen Wasserbedürftigkeit und ihren sonstigen Anpassungen flüssige Substrate am nächsten. Auch die im Innern der Organe parasitierenden Erreger leben ja größtenteils in der intracellulären Lymphe in einem flüssigen Medium, und das Zellplasma, in dem sich einige Erreger normalerweise entwickeln, steht in seinen Konsistenzverhältnissen den Flüssigkeiten näher als den festweichen Körpern.

Flüssigkeiten sind demnach ohne Zweifel das natürlichste Medium für die künstliche Mikrobekultur und haben auch noch andere, später zu besprechende Vorzüge. Da aber flüssige Nährböden die Gewinnung von Reinkulturen nicht oder doch nur auf umständlichen Umwegen gestatten, falls man nicht von einem nur mit einem einzigen Erreger infizierten Material ausgehen kann, so sind für die bakteriologische Praxis feste Nährböden ein unbedingtes Erfordernis. Aber die Bakteriologie ist auf dem bequemen und geraden Wege, der ihr durch die geniale Tat *Robert Kochs*, die Erfindung der festen Kulturnährböden, eröffnet wurde, doch vielleicht etwas zu einseitig gefolgt.

Bei den festen Nährsubstraten kommen für die Beurteilung ihrer Geeignetheit zu kulturellen Zwecken ihre Elastizität, ihre Dauerhaftigkeit und Widerstandskraft gegen thermische und peptische Einflüsse, ihre Durchsichtigkeit und vor allem chemische Indifferenz und Diffusibilität in Betracht. Von geringerer Bedeutung ist der Umstand, ob das Gel selbst von den Keimen als Nährstoff benutzt werden kann oder nicht. Ein Abbau der festen Stützsubstanz des Nährbodens ist, wenn überhaupt möglich, nur für einen Teil der Keime durchführbar, für die anderen nicht, und immer mit einer Lösung des Gels verknüpft, die diagnostisch einen gewissen Wert haben kann, für die Kultivierung

selbst aber durch Beeinträchtigung des Prinzips der Kultur eher einen Nachteil bedeutet. Gerade die Zuverlässigkeit der Formhaltung ist eines der wesentlichsten Erfordernisse eines festen Substrates. Es wird gefährdet besonders durch peptische Wirkungen der Bakterien und höhere Temperaturgrade. Beiden Einflüssen ist der tierische Leim, die Gelatine, in besonders hohem Maße zugänglich, ein Umstand, der dieses so wertvolle, vorzügliche Substrat immer mehr aus der bakteriologischen Praxis verschwinden läßt, obwohl es den Vorzug glasklarer Durchsichtigkeit in höchstem Maße besitzt. Den Umriss und die Struktur der Kolonien, die in klarem Nährboden bei durchfallendem Licht am schönsten hervortreten, kann man auf trübem Substrat in auffallendem Licht zwar auch erkennen, besonders bei Lupenbetrachtung, die für saubere Arbeit in der Bakteriologie ohnehin unentbehrlich ist. Der trübe oder gefärbte Nährgrund bietet auch den Vorteil, daß der Farbton der Kolonien etwas besser hervortritt als auf ganz klarem Grunde. Alle diese Vorzüge ohne wesentliche Schattenseiten vereinigt gegenwärtig das Pflanzengel Agar-Agar in sich. Es ist jetzt zweifellos das wichtigste Nährbodensubstrat. Vielleicht könnten ihm zukünftig in der Gestalt anorganischer Gele Konkurrenten entstehen. Bis jetzt behauptet es diesen gegenüber durch seine chemische Indifferenz noch unbestritten den Vorrang.

Von größter Bedeutung für die Kulturverhältnisse auf festem Material ist seine Diffusibilität, der Widerstand, den es dem Hin- und Abströmen der in ihm enthaltenen gelösten Stoffe entgegensetzt. Je leichter der Austausch zwischen den mit Kolonien bewachsenen Teilen des Substrates und den nicht bewachsenen vor sich geht, umso vollständiger wird der Nährboden ausgenutzt, umso länger können die Keime wachsen und sich vermehren, umso später setzen mit dem Stillstand degenerative Vorgänge in der Kultur, bzw. der einzelnen Kolonie ein.

Das osmotische Zuströmen der Nährstoffe wird hauptsächlich von der durch die Verdunstung und auch die Zusammenziehung des Gels veranlaßten Wasserströmung hervorgerufen. Ein eigentlicher Saugdruck ist bei den Mikroben nicht sicher nachgewiesen worden. Die Wanderung der Nährstoffe wird demzufolge durch einen hohen Wassergehalt des Substrates erleichtert und auch verlängert. Je mehr Wasser in einem Nährboden vorhanden ist, umso später wird die Verdunstung jenen Grad der Verarmung an Lösungsmittel erzeugen können, die einen Austausch krystalloider Körper aus der Tiefe des Nährgemisches nach der Oberfläche nicht mehr gestattet. Die intensive Quellbarkeit, die Fähigkeit zur Aufnahme großer Wassermengen ist daher einer der wichtigsten Vorzüge eines geeigneten Nährbodensubstrates, und die Fähigkeit des Agar-Agar, diese Eigenschaft mit einem sehr beträchtlichen Grade von Elastizität zu vereinigen, bedingt vorwiegend seinen großen Wert als Grundlage für feste Nährböden.

Die Ausnutzung der Nährstoffe eines festen Kultursubstrates bis in gewisse Tiefen hinab hat zur Folge, daß nicht nur seine Oberfläche für

die Quantität der Keimernte in Betracht kommt, sondern ebenso seine Masse. Man erhält in gleicher Zeit von einer Kulturplatte von doppelter Dicke bei gleichbleibender Oberfläche im allgemeinen auch die doppelte Kulturmasse. Bei höheren Graden der Differenz tritt der entsprechende Unterschied im Kulturergebnis erst nach längerer Bebrütung hervor. Jedenfalls aber ist diese Abhängigkeit des Wachstums von der Masse des Nährbodens von Bedeutung bei der üblichen Bewertung großer Bakterienmengen.

Die Entwicklung von Kolonien, zu der viele Kleinwesen auf festen Nährböden sich zwingen lassen, ist eine unerläßliche Bedingung für die Gewinnung von Reinkulturen. Die Kolonie ist aber auch ein Gebilde von größter morphologischer und damit diagnostischer Wichtigkeit. Sie erscheint durchaus als organisches Gebilde von hoher Gesetzmäßigkeit, einer Gesetzmäßigkeit, die umso wunderbarer ist, als die Bedingungen zur Entwicklung solcher Formen ganz außerhalb der Möglichkeiten des natürlichen Geschehens liegen. Der so außerordentlich zarte, spezifische, von der Art des Nährbodens gesetzmäßig abhängige Bau der Kolonie ist der primäre, noch nicht reaktiv und selektiv beeinflusste Ausdruck einer immanenten morphologischen Anlage des bakteriellen Einzelindividuums, die hervortritt, sobald sich die Notwendigkeit zur Bildung eines sozialen Verbandes ergibt.

Hat nun der feste Nährboden die Mikrobiologie auch von dieser Seite gefördert und ihr ein wertvolles morphologisches Element in die Hand gegeben, das nicht mehr zu entbehren ist, so darf doch andererseits nicht vergessen werden, daß der Zustand, in dem sich die Keime unter solchen Kulturbedingungen befinden, von ihren natürlichen Lebensgewohnheiten weit abweicht. Das Wachstum in dicht gedrängten Verbänden, in Kolonien und Kulturrasen ist für die meisten Mikroorganismen mit ihren im wesentlichen negativen, destruktiven Eigenschaften, die eine symbiontische Vergesellschaftung gleichartiger Individuen erschweren, ein künstlich erzwungener Zustand. Die Kleinwesen, insbesondere die Bakterien, sind Individualisten, auf ein Einzelleben eingestellt und für dieses mit sehr wirksamen Waffen ausgestattet, die im Kampfe mit andersartigen Zellen und Mikroben wertvolle Dienste leisten, im dicht gedrängten Kulturleben sich aber oft gegen die Artgenossen selbst richten und zum Untergang der Verbände beitragen.

In gewissem Grade treffen die Nachteile der Kulturhaltung für jede Art der Reinkultur zu; am meisten ausgeprägt aber sind sie zweifellos bei der Züchtung auf festem Substrat. Es kommen dabei wesentlich zwei Momente in Betracht, einmal der zum Hungerzustand führende Verbrauch der Nährstoffe und zweitens die durch das Wachstum der Keime im Nährboden erzeugten Umsetzungen. Welcher von beiden Punkten für den Wachstumsstillstand und die ihm folgende Degeneration und das Absterben der Kulturen der wesentlichere ist, steht noch dahin, ist wohl auch bei den verschiedenen Keimarten nicht einheitlich zu be-

werten. Wahrscheinlich aber dürfte der Mangel an vielleicht besonders gearteten Nährstoffen den ersten Anstoß zu dem degenerativen Entwicklungsgange der Kulturen abgeben. Doch macht er allein das über-raschend schnelle Absterben mancher Kulturarten noch nicht verständlich.

Eine Verarmung des Substrates an Nährstoffen tritt am frühesten in den zentralen Teilen einer Kulturplatte ein, dort, wo das älteste und stärkste Wachstum erfolgt und zugleich der Ersatz der verbrauchten Nährstoffe durch Diffusion von den Randteilen her am schwierigsten ist. Daher finden sich im Zentrum eines Kulturrasens oft nur noch tote Keime, während die Randpartien, wo Nährstoffe aus der Umgebung verfügbar sind, noch Leben zeigen. Ebenso bleiben isoliert liegende Einzelkolonien wegen der langsameren Ausnutzung des umgebenden Nährbodens länger lebensfähig als ein einheitlicher Kulturrasen auf dem gleichen Material.

Der Nährstoffmangel an sich kann nun aber als negatives Moment noch nicht die Ursache des Todes der Kulturkeime sein, besonders, da die Bakterien nicht so sehr auf ständig fortlaufenden Lebenstrieb eingestellt sind. Dafür sind vielmehr von den Kulturen selbst hervor-gebrachte Stoffe verantwortlich zu machen.

In erster Linie kommen da Reaktionsänderungen der Nährsubstrate in Betracht, verursacht durch die Anhäufung saurer oder alkalischer Endprodukte des Stoffwechsels der Keime. Insbesondere sind es die organischen Säuren, die oft ein schnelles Absterben der gesamten Kultur bewirken. Die ständige Neutralisierung der produzierten Säure durch Kreide- oder Marmorstaub ist bei vielen Bakterienarten von wesentlichem Einfluß auf die Lebensdauer der Keime.

Außer solchen chemisch wohl definierten Stoffen spielen ferner noch Giftstoffe von fermentartiger Natur eine deletäre Rolle in vielen Kulturen. Seltener sind das Körper mit allgemein proteolytischen, peptischen Wirkungen, wie sie in besonderer Menge von den Vibrionen, dem *Bacterium pyocyaneum*, manchen echten Bacillen gebildet werden. Diese Stoffe wirken lytisch auf die eigenen und auf artfremde Keime und bewirken eine Aufhellung der Kulturtrübungen und ein Glasigwerden der Kulturrasen. Von diesen allgemein tryptisch wirkenden Körpern unterscheiden sich die als Autotoxine bezeichneten durch ihre Spezifität. Die Autotoxine sind noch ganz dunkle, nur aus ihrer schädigenden Wirkung auf die Kulturen erschlossene Körper, die nur auf die eigenen Produzenten abtötend wirken, während sie andere Keimarten unbeeinflusst lassen. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Körpern nicht um Sekrete der Bakterienzelle, sondern um Auflösungsprodukte, die entstehen, sobald in einem Kulturrasen degenerative Prozesse eintreten. Körper von dieser Wirkung muß man besonders bei manchen Keimen von geringer chemischer und fermentativer Energie annehmen, wie bei den Meningokokken, Gonokokken, Influenzabacillen. Man könnte die

Wirkung dieser angenommenen Gifte als die Folge der natürlichen Kurzlebigkeit dieser Keime deuten, wenn nicht die Plötzlichkeit des Absterbens der Kulturen mitten im üppigsten Wachstum dagegen spräche. Man beobachtet nicht selten, daß diese Keime bei gleichzeitiger Aussaat auf einem weniger geeigneten Nährboden noch leben, während sie auf einem Material, das ihnen ein besonders üppiges Wachstum gestattete, zu gleicher Zeit schon abgestorben sind. Die Kürze der Lebensdauer der Keime kommt hier für die Erklärung nicht in Betracht. Wahrscheinlich steht der plötzliche Tod solcher Kulturen mit der Üppigkeit des Wachstums in Zusammenhang, die auch zur Entstehung reichlicher autotoxisch wirkender Zerfallsprodukte der Kultur führt. Den ersten Anlaß zur Bildung dieser Zerfallsprodukte dürften allerdings Ernährungsstörungen abgeben, in der Weise, daß bei üppigstem Wachstum die Nährstoffzufuhr leidet, daß dadurch einzelne Keime in Hungerzustand geraten, degenerieren, zerfallen und nun durch ihre Auflösungsprodukte benachbarte Keime in den Kreis der Degeneration und des Zerfalles hineinziehen. So schreitet der Prozeß schnell und unaufhaltsam fort. Die Selbstgifte wirken offenbar nur am Orte ihrer Entstehung, in kleinem Umkreise, bei möglichst hoher Konzentration. In flüssigen Nährgemischen, die eine schnelle Verteilung dieser Stoffe gestatten, tritt ihre Wirkung erst erheblich später ein. Verzögert wird sie ferner durch die Gegenwart großmolekularer Eiweißkomplexe, labiler reaktionsfähiger Körper, die für die in ihnen suspendierten Bakterien die Rolle von Schutzkolloiden übernehmen, indem sie die Produkte der eigenen Lebenstätigkeit dadurch, daß sie sie sogleich bei ihrer Entstehung abbinden, von ihnen fernhalten.

Die Autotoxine sind labile Stoffe, die beim Erhitzen eines Kulturrasens so gänzlich zerstört werden, daß die toten Bakterienleiber, in einem Nährboden verarbeitet, nicht nur nicht mehr wachstumshemmend wirken, sondern sogar als Nährstoff für die eigenen Artgenossen dienen können. Solche autophagen Fähigkeiten besitzen besonders anspruchslöse saprophytische Keime. Doch sind auch manche parasitischen Keime auf einem Nährboden, der nur ihr eigenes Eiweiß als abbaufähigen Stoff enthält, zu ziemlich üppiger Vermehrung befähigt.

Nur wenige Keime sind gegen ihre eigenen Lebensprodukte so hochgradig empfindlich, daß ihre Fortzüchtung in Oberflächenkulturen Schwierigkeiten macht. Die meisten Bakterienarten haben unter diesen Bedingungen eine sehr beträchtliche Lebensdauer. Die Erhaltung der Vermehrungsfähigkeit bei ruhender Vermehrung ist im wesentlichen wohl eine Funktion der Bakterienhülle. Im allgemeinen bleiben Keime mit einer derben, lipoid- oder fetthaltigen Hülle länger vermehrungsfähig als Bakterien mit einer zarten, hinfalligen Membran. Die Lebensdauer steht daher in gewissen Beziehungen zur Färbbarkeit der Keime. Die meisten säurefesten und grampositiven Bakterien gehören zu den langlebigen Arten, während die empfindlichen fast ohne Ausnahme in der Gruppe der gramnegativen stehen. Eine Ausnahme macht der

Pneumokokkus. Aber diese Art büßt beim Altern vielfach ihre Färbbarkeit nach der *Gramschen* Methode ein. Wie wichtig die Beschaffenheit der Hülle für die Lebensdauer der Kleinwesen ist, zeigt besonders auch die Spore, in der die latente Vitalität der Kleinwesen ihr Höchstmaß erreicht. Bei der Spore ist die säurefeste oder wenigstens grampositive Hülle so derb und resistent entwickelt, daß auch unter den ungünstigsten Umständen ein Wasserverlust und die durch ihn hervorgerufene Entmischung des Eiweißes — die allgemeine letzte Ursache des Todes im Reiche der Kleinwesen — lange verhindert wird.

Die günstige Wirkung des Abschlusses der Mikrobenzelle durch eine schützende Hülle liegt wahrscheinlich auch dem paradoxen Verfahren der Konservierung virulenter Pneumokokken zugrunde. Der sonst so empfindliche Keim bleibt, im Blute infizierter Tiere im Exsiccator einer schnellen Eintrocknung unterworfen, viele Monate hindurch lebensfähig und virulent. Handelt es sich hierbei auch nicht eigentlich um Kulturverhältnisse, sondern um ihr Gegenteil, eine Starre, in die der Keim durch die plötzliche Entziehung der lebenswichtigsten Elemente versetzt wird, so zeigt die Tatsache doch, daß der Keim an sich durchaus keine so kurze Lebensdauer besitzt, wenn er gegen die Einwirkung der Luft, gegen fortdauernden Wasserverlust und die kulturellen Schädigungen geschützt ist. Auch anderen empfindlichen Erregern ist im Organismus durchaus keine so enge Grenze der Lebensdauer gezogen. Die ihrer Natur nicht entsprechenden Bedingungen sind es, denen die Keime in den Kulturen erliegen, und die möglichst getreue Nachahmung der im Organismus gegebenen Verhältnisse ist der Weg, auf dem vielleicht eine Methode von größerer Sicherheit und umfassenderer Verwendbarkeit gefunden werden wird. Die Auffindung einer solchen Methode, eines solchen Ersatzes für den Organismus, würde nicht allein für die Züchtung empfindlicher Bakterienarten Bedeutung haben, die immerhin auch mit den jetzt gewöhnlich verwendeten kulturellen Hilfsmitteln zu züchten sind, sie dürfte vor allem auch geeignete Grundlagen für Züchtungsversuche mit solchen Erregern in die Hand geben, deren Kultivierung bis jetzt überhaupt noch nicht gelungen ist. Vielleicht liegt in dieser Richtung auch die Möglichkeit der Entdeckung einer Universalmethode für die Züchtung aller pathogenen Keime.

Versuche, gewissermaßen einen Organismus *in vitro* als Grundlage für Mikrobenkulturen zu schaffen, sind schon oft gemacht worden. In allen diesen Versuchen tritt das Bestreben zutage, im Reagensglase auf irgend eine Weise etwas der chemischen Stoffbewegung des lebenden Organismus Analoges zu schaffen. Denn das ist ja, wie schon oft betont wurde, der wesentliche Unterschied zwischen den üblichen Kulturbedingungen und der natürlichen Existenz der Kleinwesen, daß in letzterer ständige Bewegung herrscht und unablässig Umsetzungen spielen, während in der Kultur stofflich eine einförmige, starre Ruhe herrscht. Unter natürlichen Bedingungen entwickeln sich am Orte des Mikroben-

lebens unendlich vielfältige und verschiedene Abbauprodukte des organischen Stoffes, aus denen sich jeder Keim das ihm Zusagende herausziehen kann. Die Stoffe entstehen nicht in einseitigem Übermaß, sondern werden durch entsprechenden Verbrauch in einem labilen Gleichgewichtszustand erhalten. Auch die Lebensprodukte jedes Keines werden durch die Tätigkeit anderer Lebewesen, seien es nun Zellen oder saprophytische Symbionten, sogleich aufgegriffen, fortgeführt, abgebaut, so daß sie sich nicht im Übermaß anhäufen können. In unseren Reinkulturen dagegen spielt ein einseitig gerichteter Entwicklungsengang nach Verbrauch und Produktion, der schließlich zum Stillstand führen muß.

Die Beseitigung der schädlichen Abbauprodukte ist unter den Bedingungen der Reinkultur eine besonders schwierige Aufgabe. Vielleicht gelingt es, ihr auf dem Wege der Osmose näher zu kommen. Ein anderer Weg ist ihre Unschädlichmachung durch Bindung an großmolekulare labile Körper, die den zu züchtenden Keimen gegenüber die Rolle von Schutzkolloiden übernehmen. Stoffe dieser Art, die gleichzeitig eine ergiebige und abwechslungsreiche Nährquelle abgeben, liegen nun im genuinen tierischen Eiweiß vor. Von diesem Material sind denn auch alle Versuche, den pathogenen Mikroorganismen natürlichere Bedingungen im Reagensglase zu bieten, ausgegangen. Die Verwendung kleiner Mengen von Blut oder Serum zur Verbesserung der üblichen Nährsubstrate, die Methode *Tarozzis*, die Organstückchen als Reizmittel für das Bakterienwachstum benutzt, die komplizierten Nährböden *Noguchis*, in denen die Vereinigung frischer Organstückchen mit nativem Serum-eiweiß unter anaeroben Bedingungen die Absicht, einen Organismus in vitro zu schaffen, besonders klar erkennen läßt, und schließlich die Züchtung pathogener Keime in reinem nativem Tiereserum unter Luftabschluß sind Etappen auf diesem Wege, der in Zukunft wohl noch zu weiteren Erfolgen führen wird.

Die letzterwähnte Technik scheint besonders für die Fortzüchtung von Kulturenansammlungen geeignet, da sie bei großer Einfachheit sehr billig arbeitet und durch Vermeidung der häufigen Überimpfungen viel Zeit erspart.

Zur Technik dieses Kulturverfahrens sei kurz bemerkt, daß das steril abgenommene und klar abgesetzte Serum irgend einer Tierart — für empfindliche Keime ist Kaninchen- oder Meerschweinchen-, auch Menschenserum besonders geeignet — in konzentriertem Zustande oder in gewissen Verdünnungsgraden mit sterilem Leitungswasser am besten in engen, 0.75—1.0 cm breiten Reagensgläschen in einer Menge von 1.5—2 cm³ eingefüllt, $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56—60° erhitzt und dann sogleich mit sterilem Paraffin überschichtet wird. Nach dem Erkalten wird das Serum mit einer zu dichter Emulsion verriebenen größeren Menge der zu züchtenden Keime, etwa 2—3 Ösen, mittels einer sterilen Glascapillare beimpft. Nach guter Durchmischung der Brutwärme ausgesetzt, entwickelt die Kultur in 24—48 Stunden eine meist schwache Trübung, die

sich alsbald zu Boden setzt. Je nach der Art der Keime hebt man die Kulturröhrchen weiterhin bei Brutschrankwärme — 30° genügen auch für die wärmebedürftigen Arten wie Gonokokken, Meningokokken und Influenzabacillen — bei Zimmertemperatur oder im Eisschranke auf.

Soll von einer solchen Dauerkultur eine Gebrauchskultur angelegt werden, so wird eine geringe Menge, etwa 0.1 cm³ des aufgeschütteten Bodensatzes mit einer sterilen Capillarpipette durch das Paraffin hindurch entnommen und auf einem geeigneten festen Nährboden — sehr gut eignet sich hierfür der früher gekennzeichnete Blutagar — ausgesät. Die Dauerkultur hält sich nach der Art der gezüchteten Keime monate- oder jahrelang. Einer Überimpfung in neues Serum muß, da dafür größere Kulturmengen gebraucht werden, eine Kulturpassage über ein festes Nährmedium vorausgeschickt werden.

Auf diese Weise lassen sich alle pathogenen Bakterien züchten, außer den ganz strengen Aerobiern, wie etwa den Schimmelpilzen, und den in Form oberflächlicher Kulturhäutchen wachsenden, wie dem Tuberkelbacillus. Meningokokken, Gonokokken und Influenzabacillen bleiben, unter diesen Bedingungen frisch aus dem Körper genommen, etwa 14 Tage bis 4 Wochen, später, an die Kulturhaltung gewöhnt, mehrere Monate, ja jahrelang in demselben Kulturröhrchen lebensfähig. Die Haltbarkeit der anderen Keime ist eine sehr erhebliche, auch bei den für strenge Aerobier geltenden Vibrionenarten. *Spirochaeta icterogenes*, die *Recurrentis*-formen und *Spirochaeta gallinarum* liefern auf diese Weise dauernd fortpflanzungsfähige Kulturen, *Spirochaeta pallida* und die Trypanosomen halten sich etwa 10 Tage, bzw. mehrere Wochen und zeigen typische Teilungen und eine nicht unerhebliche Vermehrung.

Die Gründe, aus welchen diese Kulturhaltung den pathogenen Kleintieren so förderlich ist, dürften in erster Linie darin zu suchen sein, daß das tierische, inaktivierte Serum ein sehr nährstoffreiches, aktiv indifferentes, passiv aber sehr reaktionsfähiges, daher als Schutzkolloid wirkendes Medium darstellt. Es umhüllt die Keime mit einem Mantel, der chemische Einflüsse abfängt oder, wie auch physikalische Wirkungen, wesentlich mildert. Gleichzeitig aber gibt es aus seinen großen Komplexen durch autolytische Spaltungen oder fermentative Wirkungen der Keime selbst dauernd eine Fülle verschiedenartiger Bausteine als Nährstoffe ab. Eine Verarmung des Mediums ist wegen der großen Menge der darin enthaltenen Nährstoffe auch bei langer Dauer der Kultur ausgeschlossen, auch nicht lokal am Boden des Röhrchens, wo sich die Hauptmenge der Keime ansammelt, weil die Diffusion in genügender Weise für Ersatz sorgt.

Sehr wichtig ist schließlich auch der Sauerstoffabschluß, einmal weil die Anaerobiose den pathogenen Keimen, wie oben auseinander-gesetzt wurde, der angemessenste Lebenszustand ist, sodann, weil er der schrankenlosen Vermehrung und demzufolge dem rapiden Nährstoffverbrauch und der massenhaften Bildung giftiger Stoffwechselprodukte

und autolytischer Gifte entgegenwirkt. Schließlich verhindert der Luftabschluß jeden Wasserverlust und damit ein Steigen der Konzentration der gelösten Körper, die ja für das Leben der Mikroorganismen besonders deletär ist.

Aber auch diese Technik wird noch nicht allen Anforderungen der pathogenen Keime gerecht. Wie schon erwähnt, vermehren sich Syphilis-spirochäten und Trypanosomen unter diesen Bedingungen, doch bleibt die Zahl der neuentstehenden Keime immer geringer als die der absterbenden, so daß die Kultur schließlich erlischt. Wahrscheinlich fehlt dem Nährboden die Reizwirkung des natürlichen Wachstumsmediums, die vielleicht durch celluläre oder symbiontische Wirkungen wird geschaffen werden können.

Für die Mehrzahl der pathogenen Keime sind diese Kulturbedingungen aber durchaus zureichend. Es wäre nicht einmal zweckdienlich, sie zu lebhafterem Wachstum zu veranlassen, so daß sie sich in maßloser Weise vermehren, Generation auf Generation häufen, dabei mutative Abänderungen erleiden und schließlich Kulturen liefern, die in ihren biologischen Verhältnissen ein fremdartiges Gepräge zeigen. Wertvoller ist für den Bakteriologen eine spärliche, eben ausreichende Vermehrung, die sich in biologischer Beziehung in den Bahnen der Ausgangskultur hält, besonders auch hinsichtlich der Immunitätsverhältnisse und der Virulenz, für deren Erhaltung die Dauerkultur in Serum ebenfalls sehr Brauchbares leistet.

Brutschränke und Thermoregulatoren (Apparate zur Züchtung).

Von Prof. Dr. med. u. Dr. med. vet. **E. Küster**, Oberursel i. T.

Mit 37 Textabbildungen.

Alle Lebewesen, auch die kleinsten Spaltpilze und Protozoen, bedürfen zu einer gedeihlichen Entwicklung einer bestimmten Körperwärme. Diese kommt zustande einmal durch die im Lebensprozeß der Organismen freiwerdende Wärmeenergie und weiterhin durch den Einfluß der Wärme der äußeren Umgebung. Je kleiner das Lebewesen selbst, umso geringer ist die absolute Eigenwärmebildung. Da ferner mit der Kleinheit der Körper die Oberfläche relativ wächst und diese für die Größe der Wärmeab- bzw. -aufnahme aus der Umgebung maßgebend ist, so sind kleine Tiere und Pflanzen im höchsten Maße von der sie umgebenden Außentemperatur abhängig. Die Eigenwärmeproduktion der Spaltpilze, um deren Züchtung es sich in diesem Zusammenhang in erster Linie handelt, ist praktisch so belanglos, sie vermag diesen Lebewesen so wenig Unabhängigkeit von den äußeren Temperatureinflüssen zu verleihen, daß wir sie bei einer Behandlung der Wärmebedürfnisse von Mikroorganismen gar nicht in Rechnung setzen können. Nur die Außentemperatur ist für die Entwicklung der Spaltpilze maßgebend. Unter diesen Gesichtspunkten unterscheiden wir nach *Lehmann* drei verschiedene Gruppen von Mikroben:

1. Psychrophile: sie gedeihen noch bei einer Temperatur von 0° (vielleicht auch darunter), entwickeln bei 15—20° ihre größte Lebens- und Wachstumskraft und vertragen auch ohne wesentliche Schädigung eine Wärme bis zu 30°.

2. Mesophile: sie gedeihen bis zu einer Temperatur von 10—15°, wachsen und vermehren sich am üppigsten bei 37° und finden ein Fortkommen bis zu 45°.

3. Thermophile: sie vermehren sich noch bei 34—49°, gedeihen am besten von 50—55° und vertragen noch Wärmegrade von 60—70°.

Für jedes Bakterium können wir demnach ein Temperaturminimum, -optimum und -maximum feststellen. Die größte Bedeutung hat natürlich das Optimum. Psychrophile und Mesophile finden ihr Optimum leicht unter natürlichen Verhältnissen im Freien oder im

Organismus von warmblütigen höheren Tieren. Anders die Thermophilen; sie verlangen Temperaturen zum optimalen Wachstum, die, abgesehen von warmen Quellen, in freier Natur kaum vorkommen. Dennoch ist ihre Verbreitung viel größer, als man für gewöhnlich anzunehmen geneigt ist; sie finden sich z. B. ständig im Darmkanal des Menschen. Wie hier ihr Gedeihen möglich ist, ist mit Sicherheit noch nicht festgestellt. Es können symbiotische Verhältnisse oder auch die bei den Spaltungsprozessen der Verdauung freiwerdende höhere Wärmemenge das begünstigende Moment abgeben.

Die Grundlage für jede Bakterienforschung bildet die Bakterienzüchtung; da, wie eben ausgeführt, die einzelnen Keime zu ihrem besten Wachstum bestimmte Temperaturen, die bald über, bald unter der Außentemperatur liegen, benötigen, so ist eine erste Forderung der Bakteriologie die dauernde Erzeugung bestimmter Wärmegrade bzw. -breiten.

Die größte Zahl der wegen ihrer krankmachenden Wirkung zunächst am wichtigsten erscheinenden Bakterienarten gehört zu den Mesophilen. Da sie eine große Wachstumsbreite und ein Optimum, das mit der Körpertemperatur der Warmblüter zusammenfällt, besitzen, so ist die Züchtung, geeignete Nährmedien vorausgesetzt, schon mit relativ einfachen Hilfsmitteln möglich. Im Notfalle kann schon der tierische bzw. menschliche Organismus die nötige Wärme abgeben. Steckt man beimpfte Kulturröhrchen (gegen Bruch eventuell durch eine Blechhülse geschützt) in die Westentasche, so reicht die hier herrschende Körperwärme aus, um das Wachstum der Mesophilen zu ermöglichen. Wenn es sich darum handelt, Keime oder Infektionsmaterial, das sehr kälteempfindliche Bakterien enthält, z. B. Meningokokken- und Gonorrhöe-eiter, größere Strecken lebend zu transportieren, so kann man von dieser bequemsten und stets vorhandenen animalischen Wärmequelle sehr wohl Gebrauch machen. In zweiter Linie käme für den Transport, der ja die Benutzung einer Heizflamme als Wärmesponder gewöhnlich ausschließt, die Verwendung von Substanzen in Betracht, die eine größere Wärmemenge in sich aufgespeichert besitzen und diese bei geeigneter Isolation nur langsam abgeben. Ein doppelwandiges Gefäß, dessen Mantelraum mit körperwarmem Wasser gefüllt und durch Umwickeln von Papier, Watte, Filz, Linoleum, Kork u. s. w. gegen raschen Wärmeverlust geschützt ist, kann für Stunden schon einen brauchbaren Brutraum abgeben. Besser als Warmwasser zur Füllung derartiger Transportbehälter ist die Verwendung von geeigneten warmen Salzlösungen, wie z. B. Natriumacetatlösung, die beim langsamen Auskrystallisieren (durch Erkaltung) lange Zeit hindurch reichlich Wärme abgeben kann. Sehr gut und einfach einzurichten ist auch die Erwärmung isolierter Behälter durch Einlegen eines der vielen im Handel befindlichen Wärmeapparate (Thermophore): Handwärmer, Wärmekissen u. s. w.

Handelt es sich um eine Warmhaltung von Bakterienkulturen an Ort und Stelle, also um eine Bebrütung im Arbeitszimmer, so wird man stets eine Wärmequelle wählen, die bei geringer Wartung lange Zeit vorhält: eine Flamme, die mit Öl, Petroleum, Spiritus oder Gas gespeist wird, oder endlich eine elektrische Heizung in Form von Glühbirnen bzw. Heizspiralen.

Ist der zu heizende Brutraum (Gefäß) gut geschützt, d. h. die Wärmeabgabe an die Außenluft gering, ist die Temperatur der Zimmerluft keinen großen Schwankungen unterworfen (nach Norden gelegenes, wohlverschlossenes, starkwandiges Zimmer) und die Flamme von möglichst gleichbleibender Größe, so kann man schon ohne besondere Regulationsvorrichtungen eine brauchbare Brutwärme erzielen. Eine recht gleichmäßige Wärmequelle, die nur selten einer Nachfüllung bedarf, bietet die Öllampe mit schwimmendem Docht (Nachtlcht), während Gasflammen durch den wechselnden Gasdruck in der Leitung ohne Reguliervorrichtung zu ungleichmäßig heizen; auch Petroleum- und Spirituslicht auf Bassin mit großem Brennmaterialvorrat sind bei entsprechender Wartung brauchbar. Empfehlenswert sind auch kleine elektrische Glühbirnen, die von einer größeren Energiequelle — Stromleitung, große Batterie — dauernd mit der nötigen Kraft versehen werden; sie sind nur unter den primitiven Verhältnissen, um die es sich hier handelt, kaum zu haben und auch teuer. Als Brutraum wählt man bei unregulierten Heizflammen den bereits erwähnten isolierten doppelwandigen Topf mit Wasserfüllung, bei Glühbirnenheizung genügt ein dichtschießender starkwandiger Holzkasten, in dessen Innern die Birne brennt; eine Schutzhülse über der Birne schließt der wachstumschädigenden Einfluß der Lichtstrahlen und die direkten Wärmestrahlen aus.

Nur wo es sich um ganz vorübergehende oder gelegentliche einfache Züchtung von Bakterien handelt, wo nur geringe Geldmittel zur Verfügung stehen, billige Arbeitskräfte zur Wartung bei der Hand sind und die Wartung nicht vernachlässigt wird, kann heutzutage die eben erwähnte primitive Kulturvorrichtung noch einen Platz beanspruchen; für alle eingehenden und wissenschaftlichen Forschungen ist die Benutzung eines Brutraumes, der auch ohne große Beaufsichtigung durch Selbstregulierung dauernd eine bestimmte erwünschte Temperatur innehält, nicht zu umgehen. Derartige Thermostaten werden gegenwärtig von vielen Firmen in durchaus sicherer Bauart geliefert.

Beim Bau moderner Bruträume, die in Form von Kästen, Schränken oder Zimmern gebaut werden, wird auf großes Wärmefassungsvermögen, gute Wärmeverteilung und Beschränkung der Wärmeabgabe nach außen durch gute Isolierung besonderer Wert gelegt. Für den eigentlichen Schrankkörper pflegt man ein haltbares, durch Hitze und Wärme wenig angreifbares, möglichst inoxydables Metall zu wählen;

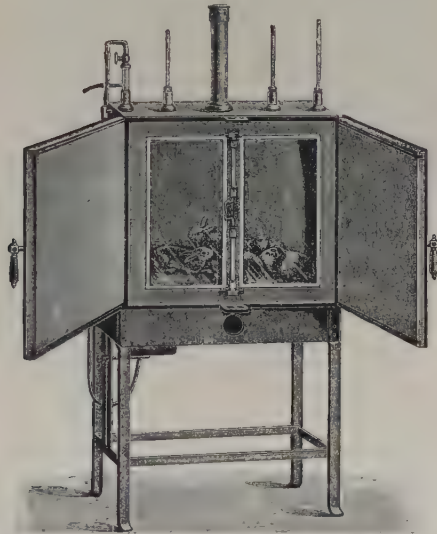
die besten Erfahrungen hat man bisher mit starkem Kupferblech gemacht und daher wendet man dieses fast allein noch an.

Boden, zwei Seitenwände, Rückwand und Decke der heutigen Brutschränke bestehen doppelwandig aus Kupferblech. Der zur Wasseraufnahme bestimmte Zwischenraum der Wände wird an einzelnen Stellen von Lamellen aus dem gleichen Metall durchsetzt: diese dienen der Stabilisierung und müssen so angeordnet sein, daß sie ihren Zweck statisch in günstigster Weise erfüllen und dabei die Zirkulation des von dem Boden her erwärmten Wassers nicht behindern. Ein seitliches Wasserstandsrohr gibt die Kontrolle dafür ab, daß die Wasserfüllung des Zwischenraumes stets vollständig ist. An der oberen Kante der Seitenwände ist beiderseits eine Tubusöffnung angebracht, durch die ein in Zehntelgrade geteiltes empfindliches Thermometer und ein Thermoregulator in das Wasser eingehängt werden. Beide werden mit Kork oder Stopfbüchse dicht eingepaßt, und da im übrigen der wassergefüllte Raum allseitig geschlossen ist und an den Tuben nur eine minimale Wasserverdunstung möglich ist, so bedarf der Wasservorrat nur höchst selten einer Nachfüllung. Die Rücksicht auf die Empfindlichkeit der Brutschrankthermometer und der vielfach benutzten Thermoregulatoren mit Quecksilberfüllung bringt es mit sich, daß ihre Quecksilbergefaße aus dünnwandigem Glas gewählt werden. Dieser Umstand bedingt allerdings eine relativ hohe Zerbrechlichkeit: gelangt nun durch Bruch des Glasrohres bei installiertem Thermometer Quecksilber in den Wasserraum des Brutkastens, so findet eine Amalgamierung des Kupfers durch Quecksilber statt: derartige amalgamierte Partien sind sehr wenig haltbar und man verhütet deshalb ein allenfallsiges Auslaufen von Quecksilber in den Wasserraum durch Einsetzen einer Schutzröhre mit geschlossenem Boden und oberen seitlichen Öffnungen für die Wasserzirkulation. Die Wasserfüllung der Zwischenräume von Boden, Wänden und Decke erfüllt einen doppelten Zweck. Sie bildet ein Wärmereservoir, welches für stundenlange Warmhaltung des Innenraumes sorgt, wenn durch irgend einen Zufall die Heizung versagt und muß deswegen möglichst groß gewählt werden: sie dient vor allem aber der Wärmeverteilung. Eine feste Wandmasse würde die von außen aufgenommene Wärme nur durch Leitung weitergeben und bei einseitiger Erwärmung würde die gegenüberliegende Innenseite am stärksten erhitzt, weil die Wärme dorthin den kürzesten Weg zurückzulegen hat. Ein luftgefüllter Zwischenraum würde zwar durch Luftströmung die Wärmeverteilung etwas verbessern, die Wärmestrahlung von einer erwärmten Außenwand auf die gegenüberliegende Innenwand aber nicht ganz verhindern; Luft hat zudem ein geringes Wärmefassungsvermögen. Wasser dagegen hat hohe Wärmekapazität und bei einseitiger Erwärmung tritt sofort eine ergiebige Strömung der erwärmten Moleküle nach oben, der kälteren, schwereren nach unten ein; hierdurch ist eine rasche und gleichmäßige Temperaturverteilung

über den Gesamtwasserraum gewährleistet. Um auch in dem inneren eigentlichen Brutraum die Wärme- und Luftverteilung nach physikalischen Überlegungen sachgerecht zu konstruieren, wird von einigen Firmen eine ovale Brutraumbodenfläche gewählt. Hierdurch sind tote Winkel allerdings vermieden, aber die erzielten Vorteile sind praktisch belanglos und wiegen die aus der Ovalform resultierende schwierigere Raumausnutzung beim Einstellen von Kulturen nicht auf.

Der Zugang zu dem Brutraum findet nur bei veralteten (aber wohl brauchbaren) Systemen von oben, heute fast allgemein durch eine Tür von der Vorderseite aus statt. Diese Tür muß natürlich möglichst wärmedicht konstruiert sein. Man kann sie, wie die Seitenwände,

Fig. 145.



doppelwandig aus Kupferblech mit Wasserfüllung bauen, wählt aber, des leichteren Gewichtes und der Handlichkeit wegen, fast stets eine Doppeltür: die innere ein Metallrahmen mit Glasfenster, die äußere aus Kupferblech mit außen aufliegender Isolierschicht. Diese Isolierschicht, welche auch Seitenwände und Decke des Brutschrankes überkleidet, bauen einige Firmen aus dickem Filz, andere aus Linoleum mit besonderer Filz- oder Korkunterlage. Beide erfüllen ihren Zweck. Die Linoleumdecke hat den Vorzug, daß sie leichter sauber gehalten werden kann. Die innere Glastür soll eine Betrachtung des Brutschrankinnenraumes ohne vollständige Öffnung, welche stets einen raschen Temperatursturz und Abkühlung der Kulturen mit sich bringt, ermöglichen. Praktisch fällt diese Vorsichtsmaßregel kaum ins Gewicht. Das Vorhandensein einer Glastür gestattet aber gelegentlich auch eine

ausgedehntere Verwendung des Brutraumes, z. B. eine Unterbringung von lichtbedürftigen Pflanzen oder Versuchstieren (Fig. 145); die äußere lichtundurchlässige Tür ist für die Züchtung licht- und wärmeempfindlicher Bakterien und Protozoen natürlich unentbehrlich.

Der Boden des Brutschrankes trägt keine Isolierhülle, weil bei Flammenheizung hier die nötige Wärme zugeführt wird. Der Boden muß sehr kräftig gebaut sein, damit auch bei jahrelangem Betrieb kein Durchbrennen eintritt. Vielfach bringen die Firmen deshalb am Boden eine besondere Kupferverstärkung an, die zum mindesten die Bodenfläche unmittelbar über der Heizflamme bedecken muß.

Bei Gasheizung wählt die Firma Rohrbeck zur sicheren Verhinderung des Durchbrennens eine praktische Einrichtung, wie sie aus nebenstehender Abbildung ersichtlich: zwischen Flamme und dem ovalen Körper des Brutraumes ist eine besondere eventuell leicht zu ersetzende Metallplatte angebracht, welche die Wärme aufnimmt und sie mit ihrer ganzen oberen Fläche an den Brutschrank durch Strahlung weitergibt (Fig. 146).

In großen bakteriologischen Laboratorien oder überall dort, wo es sich um die Produktion von Massenkulturen handelt (Serumfabriken), bevorzugt man häufig statt der sonst notwendigen vielen, transportablen Einzelbrutschränke kastenartige große Brutkammern oder eingebaute Brutzimmer (Fig. 147). Die frei im Raum aufgestellten Brutkammern haben dort den Vorzug, wo genügend starke Zimmerwände nicht vorhanden sind. Sie bestehen aus doppelwandigen gut isolierten Holzwänden, deren einzelne Felder in entsprechender Weise miteinander verbunden werden. Die Wände und die Decke der Kammer werden innen zunächst mit Ruberoid belegt, worauf ein Lattenbelag zur Erzielung einer Luftisolation befestigt wird; auf dem Lattenbelag werden Vulkanitplatten angebracht und dann Wände und Decke mit Metallplatten versehen, damit die Wärmeverteilung im Innenraum eine möglichst gleichmäßige ist. Der Fußboden wird ebenfalls gut isoliert und zweckmäßig mit Linoleum belegt. Die Inneneinrichtung besteht aus offenen oder geschlossenen verzinkten Eisenregalen mit verstellbaren Einlagen, die zur Aufnahme der Kulturen bestimmt sind. Die Erwärmung des Innenraumes erfolgt durch eine Warmwasserheizung, die allein eine gleichmäßige Temperatur gewährleistet.

Soll ein geeignetes Zimmer als Brutraum eingerichtet werden, so ist in diesem, wie bei den Brutkammern, durch eine Scheidewand zunächst ein Vorraum abzutrennen. Je nach der Stärke der Seitenwände sind diese wie auch der Boden und die Decke durch Korksteinplatten zu isolieren. Darüber kommen eine Zementschicht und alsdann die Isolationsschichten, wie bei den freistehenden Brutkammern. Auch die innere Einrichtung und die Art der Heizung ist die gleiche. Die Lage der Brutschränke für Massenkulturen im Gebäude wird so gewählt, daß unkontrollierbare Wärmeeinwirkungen (Sonne, Heizkörper, Kessel-

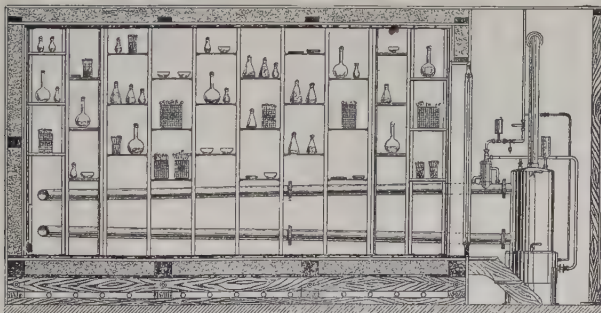
anlagen) ausgeschlossen sind; eine doppelte Isoliertür ermöglicht den Zutritt. Die Kulturen können auf geräumigen Wandetageren im Innern

Fig. 146.



Ovaler Thermostat neuester Konstruktion nach Rohrbeck.

Fig. 147.

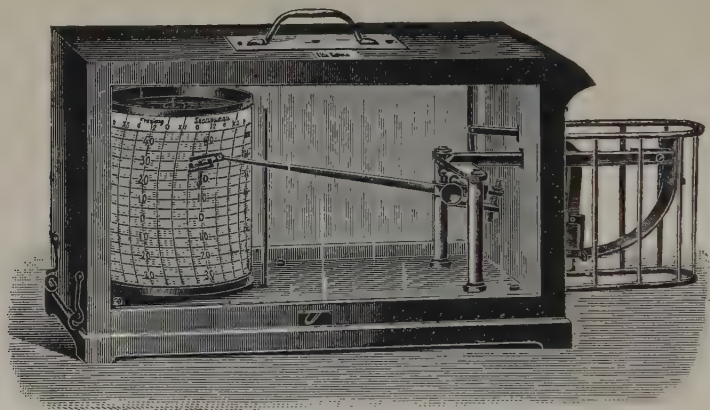


Brutzimmer nach F. u. M. Lautenschläger, Berlin.

Aufstellung finden; eine elektrische Innenbeleuchtung ist von außen einschaltbar. Ein im Vorraum aufgestellter Warmwasserkessel führt mit Warmwasserheizröhren dem Innern die nötige Wärme zu. Die Heizung des Kessels erfolgt durch Gasflammen, deren Regulierung durch

einen im Innenraum aufgehängten Thermoregulator (s. unten) erfolgt. An Stelle des Thermometers wird im Innern ein Metallthermograph (Fig. 148) aufgestellt, der mit acht Tage gehendem Uhrwerk versehen ist und die jeweilige Temperatur auf einem Thermogrammstreifen aufschreibt.

Fig. 148.



Metallthermograph von F. u. M. Lautenschläger.

Alle Kulturen von Mikroorganismen bedürfen dauernd außer der Wärme auch eines beträchtlich hohen Grades von Feuchtigkeit. Für Kulturen, die nur wenige Tage im Brutschrank verweilen, genügt hierzu der Wassergehalt des Nährbodens. Bei langsam wachsenden Kulturen muß aber die Austrocknung der Nährböden, welche in den gewöhnlichen Brutschränken innerhalb einiger Tage eintritt, besonders verhütet werden. Der vielfach übliche Verschuß des einzelnen Kulturgefäßes mit Gummikappe oder Paraffindurchtränkung der Wattepfropfen ist nur bei Keimen mit relativ geringem Sauerstoffbedarf durchführbar; in anderen Fällen muß man durch Aufstellen von Wasserverdunstungsgefäßen im Innern die Feuchtigkeit der Luft erhöhen und damit das Eintrocknen verhindern. Bei den *Rohrbeckschen* Thermostaten (Fig. 146) befindet sich zur Aufstellung der Wassergefäße ein besonderer Raum unter dem eigentlichen Brutraum; durch Verbindungsröhren steigt aus diesem Wasserdampf in regulierbarer Menge nach oben.

Als Wärmequelle für die Bruträume dient bei weitem in den meisten Fällen Gas, vielfach, speziell in neuerer Zeit, Elektrizität und nur noch selten, wenn nichts anderes zu haben, Petroleum.

Die Einrichtung des Brenners der Heizflamme ist von wesentlicher Bedeutung.

Bei sachgemäßer Isolierung des Brutraumes ist zum dauernden Ersatz der verlorengehenden geringen Wärmemenge nur eine kleine, schwachheizende Flamme erforderlich. Bei Gasheizung wäre dazu an

sich eine kleine leuchtende Flamme sehr wohl geeignet. Dieselbe hat aber den Nachteil, daß sie leicht zur Rußbildung Veranlassung gibt, besonders dann, wenn bei gelegentlich stärkerer Abkühlung die Flamme zum Ausgleich groß brennen muß. Der Ruß schlägt sich besonders auf die zu erwärmende Bodenfläche nieder, stört dort die

Fig. 149.

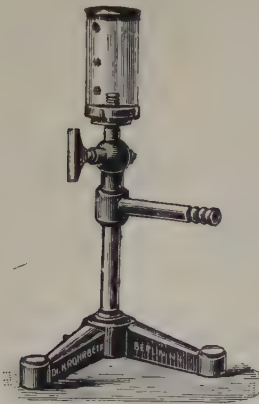
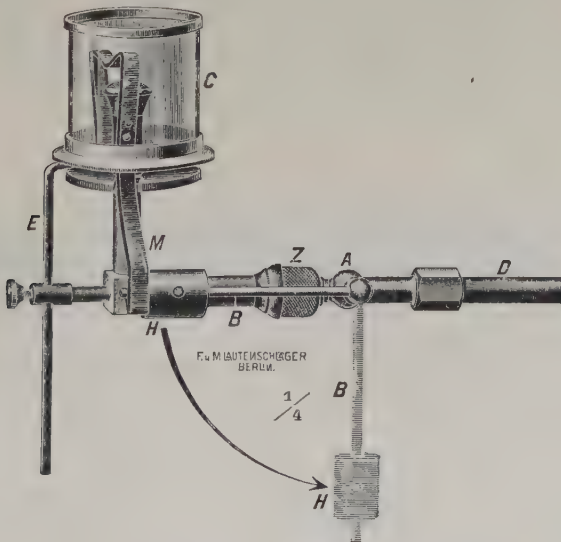


Fig. 150.



Wärmeleitung und greift außerdem das Metall an. Man brennt deswegen das Gas lieber in kleinen Bunsenbrennern, d. h. mit nicht leuchtender, nicht rußender Flamme (Fig. 149 u. 150).

Fig. 151.



Kocher Sicherheitsbrenner.

Gegenüber der leuchtenden Gasflamme hat der übliche Bunsenbrenner einen Nachteil insofern, als bei sehr kleinem Einstellen der Flamme, was bei dem wesentlich höheren Heizeffekt der Bunsenflamme

meist notwendig ist, die Flamme zurückschlägt; der Brenner wird dadurch in sich stark erhitzt, kann zu Feuergefahr führen und eine regelrechte Erwärmung ist jedenfalls ausgeschlossen.

Allen billigen Anforderungen bei der Gasheizung wird der zuerst von *Koch* angegebene und vielfach verbesserte Sicherheitsbrenner gerecht. Er ist ein Bunsenbrenner, dessen Flamme auch bei kleinster Gaszufuhr nicht zurückschlägt und bietet dazu noch den großen Vorzug, daß sein Hahn sich selbsttätig schließt, sobald durch irgend einen Umstand die Flamme verlöscht. Sein Bau ist aus nebenstehender Zeichnung ersichtlich (Fig. 151).

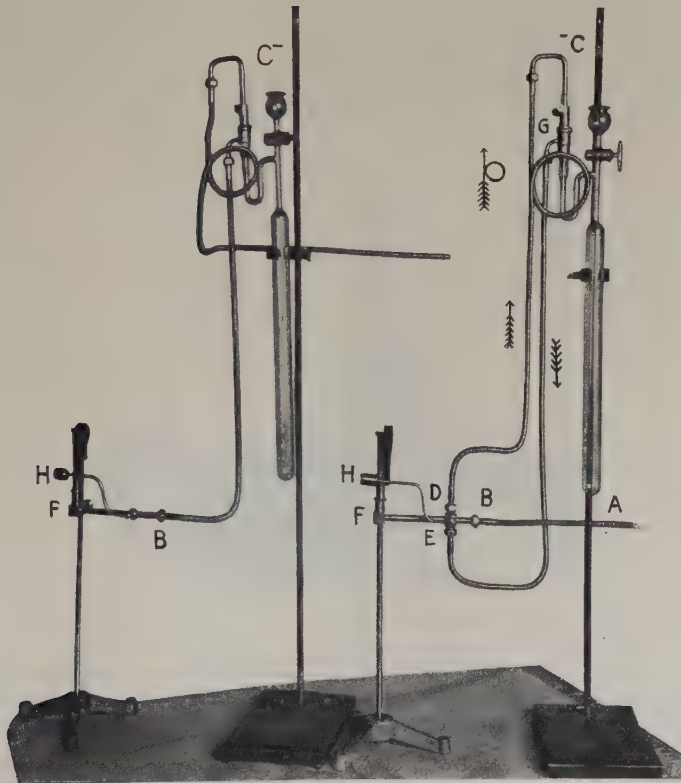
Das Gas tritt durch einen Hahn *A* ein, dessen langarmiger Zapfen *B* bei *H* mit einem Metallgewicht beschwert ist. Bei *Z* mischt sich durch die Bunsenöffnung dem Gasstrom atmosphärische Luft bei. Diese Öffnung ist zur Vermeidung von Feuergefahr und gleichzeitig zur Erzielung eines ruhigen Brennens nach außen durch ein Metalldrahtnetz, analog der *Davyschen* Sicherheitslampe, geschützt. Auch die Brenneröffnung des Gases bei *F* trägt ein Sicherheitsnetz; hierdurch wird ein Zurückschlagen der Flamme unmöglich gemacht. *M* ist eine gebogene Metallfeder, die so angebracht ist, daß sie bei brennender Gasflamme ständig heiß gehalten wird. Sie besteht aus zwei miteinander verlöteten Metallstreifen mit verschiedenem Ausdehnungskoeffizient oder neuerdings aus einem Kompositionsmetall (Bimetall). In der Hitze wird der freie Federschenkel *M* von dem Brennerrohr abgebogen und bietet dann durch einen kleinen Vorsprung eine Auflage für den Arm des Gashahnes *B*. Verlöscht die Flamme, so weicht der Federschenkel beim Erkalten zurück, der Hebel fällt herab und die Gaszufuhr ist abgeschlossen (gestrichelte Stellung des Hebels *B* in der Abbildung).

So unverkennbar auch die Vorzüge der *Kochschen* Sicherheitslampe gegenüber dem ungeschützten Mikrobrenner für Brutschränke sind, so ist ihr Schutz vor Gasexplosionen doch nur ein beschränkter. Sie löscht wohl die einzelne Flamme aus, sobald die Gasversorgung der Flamme auf ein Minimum herabgeht oder vollständig aufhört, aber wenn z. B. die Gaszufuhr unterbrochen wurde, weil an irgend einer Stelle der Leitung, am Gummischlauch oder am Regulator eine größere Undichtigkeit eingetreten war, so vermag sie nicht zu verhüten, daß das Gas durch ebendiese schadhafte Stelle in das Zimmer weiterausströmt. Die Gefahren eines solchen Zufalles sind hinreichend bekannt. Es ist deshalb eine Neukonstruktion von *Altmann*, der diese Mängel nicht anhaften, als wichtiger Fortschritt zu begrüßen und ihre Einrichtung allenthalben anzuraten. Die *Koch-Altmannsche* Sicherheitslampe (D. R. P. angemeldet) (Fig 152 rechts) ist wie folgt gebaut:

Der Gasstrom von der Hauptleitung *A* tritt bei *B* in den Gashahn ein und infolge einer besonderen Bohrung desselben durch *D* nach dem

Thermoregulator *C*, passiert diesen und gelangt auf dem Wege *G—E* zum zweiten Male in den Hahn und nunmehr durch eine zweite Bohrung nach *F* zum Brenner. Tritt auf dem Wege *B—D—C—G—E—F* an irgend einer Stelle eine Undichtigkeit auf, so verlöscht die Flamme infolge ungenügender Erwärmung der Sicherheitsmetallfeder (wie bei dem alten *Kochschen* Brenner), der Sicherheitshebel *H* fällt herab und

Fig. 152.



Alte *Kochsche* Sicherheitslampe.
Der Regulator ist in die Hauptgasleitung
eingeschaltet und von dem Lampenhahn
unabhängig.

Koch-Altmannsche Sicherheitslampe.
Der Regulator ist in einen Gasstrom ein-
geschaltet, der den Lampenhahn passie-
ren muß und durch diesen geschlossen
wird.

schließt den Gaszufluß der Hauptleitung zum Hahn: ein weiteres Ausströmen von Gas und Explosionsgefahr ist dadurch verhütet.

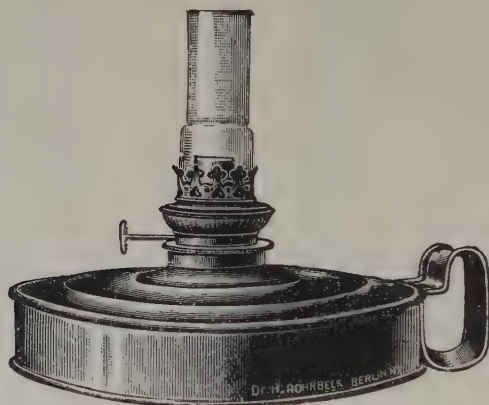
Wo es an einer zentralen Versorgung mit Leuchtkraft fehlt, benutzt man mit Vorteil die Petroleumlampe als Wärmequelle. Der Petroleumbehälter muß recht groß gewählt werden, so daß eine Füllung mit Brennstoff für 24 Stunden ausreicht. Sie hat gegenüber der leicht

rußenden Öllampe (Nachtlcht) den Vorteil der intensiveren Wärmeentwicklung und leichteren Regulierfähigkeit (Fig. 153).

Entsprechend der immer ausgedehnteren Anwendung, welche die elektrische Kraft in allen Kulturländern zu den verschiedensten Zwecken findet, geht man in neuerer Zeit immer mehr zur Heizung der Brutschränke mit elektrischen Heizröhren über.

Das Prinzip der elektrischen Heizung besteht darin, daß ein den Strom schlecht leitender Metalldraht (wegen der geringen Oxydierbarkeit am besten aus Platin) über einen Porzellankörper durch Abstand isoliert aufwickelt und das Ganze freihängend so in eine dichtschießende Metallhülse montiert wird, daß nur die beiden isolierten Enden der Drähte heraussehen. Schickt man durch den Draht den elektrischen Strom, so erhitzt sich jener und liefert eine sehr inten-

Fig. 153.



Petroleumlampe mit großem Metallbassin für Brutschrankheizung.

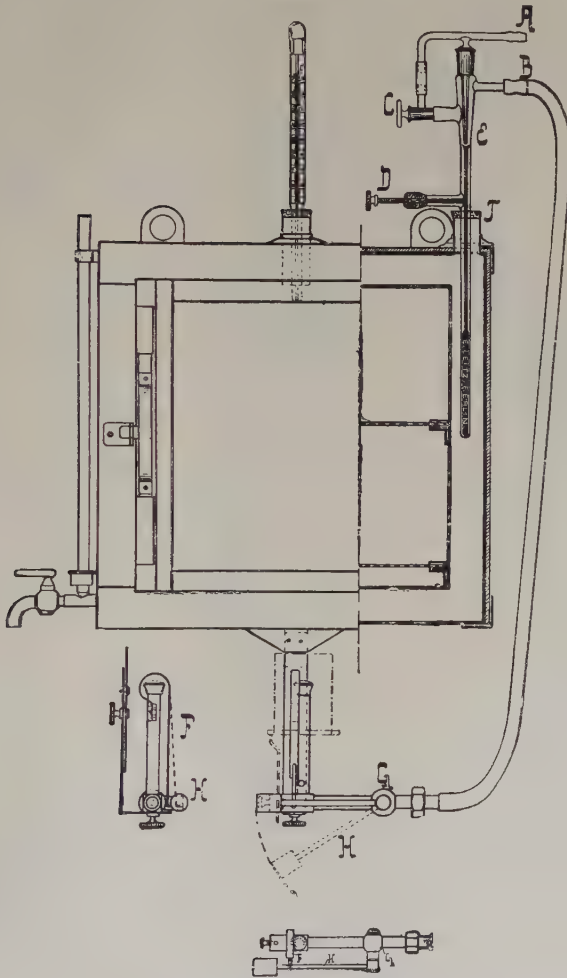
sive Erwärmung. Wird der Strom ausgeschaltet, so wird die Heizröhre rasch kalt, da sie nur geringe Wärmemenge in sich aufzuspeichern vermag. Eine oder mehrere derartige Heizröhren, die der elektrischen Stromspannung angepaßt und leicht einzuschalten sind, werden in den Wassermantel in der Nähe der Bodenfläche eingeschoben und bewirken die Erwärmung des Wassers. Eine Heizung der Bodenplatte des Brutschrankwasserreservoirs wird also umgangen und damit viel Wärmeverlust und die Gefahr des Durchbrennens vermieden.

Die automatische Regulierung der Wärmequellen für die Brutschränke ist für deren Verwendbarkeit von ausschlaggebender Bedeutung: es ist daher verständlich, daß sehr viele Bakteriologen sich mit der Konstruktion von derartigen Reguliervorrichtungen befaßt haben. Die Zahl der vorhandenen Thermoregulatoren ist dementsprechend sehr groß und nur die einzelnen Typen und die gebräuchlichsten Formen können hier behandelt werden.

Thermoregulatoren für Gasheizung.

Ihre einfachste Form kann man sich leicht selbst zusammensetzen. Ein etwa 1 cm weites und 40 cm langes Glasrohr wird einseitig zu-

Fig. 154.



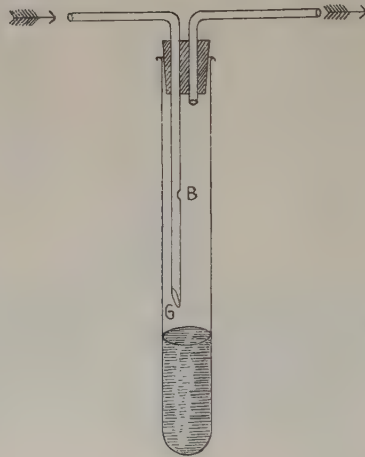
Kleiner Brutschrank von *Leitz* mit *Reichert*'schem Thermoregulator und *Koch*'scher Sicherheitslampe.

geschmolzen und ein Drittel mit Quecksilber gefüllt. Das offene Ende schließt ein doppelt durchbohrter Kork, am besten ein Gummikork (Fig. 155).

Durch eine Öffnung führt ein rechtwinklig gebogenes Rohr mit langem inneren Schenkel, welches unten schräg abgeschnitten ist und bei *B* außerdem eine kleine Öffnung besitzt. Durch die zweite Durch-

bohrung des Korkes führt das Gasableitungsrohr, welches das Gas zum Brenner führt; dieses Rohr hat einen kurzen inneren Schenkel. Die Quecksilberröhre wird möglichst tief in das zu erwärmende Wasser des Brutraumes eingehängt und die Heizflamme angezündet. An dem gleichzeitig eingehängten Thermometer beobachtet man das Steigen der Wassertemperatur und wartet, bis der erwünschte Wärmegrad erreicht ist. Nun schiebt man das Gaszuleitungsrohr so tief ein, bis die schräge Öffnung vollständig von Quecksilber verschlossen ist und nur noch durch das Notloch *B* soviel Gas ausströmen kann, daß die Flamme eben noch brennt. Infolge des Kleinwerdens der Heizflamme sinkt die Wassertemperatur und dementsprechend zieht sich die Quecksilbersäule im Regulator zusammen; dieses bewirkt eine Wiederöffnung der großen

Fig. 155.



Gaszufuhröffnung bei *G*; die Flamme brennt wieder groß und die Temperatur wird so durch das Spiel des Quecksilbers bei Ausdehnung und Zusammenziehung geregelt. Da der Ausdehnungskoeffizient des Quecksilbers verhältnismäßig klein ist, so ist der beschriebene einfachste Regulator nicht besonders empfindlich und eine genaue Einstellung der Temperatur des Brutschrankes ist nicht möglich. Die Empfindlichkeit wird verbessert, wenn man das Quecksilbergefaß nach oben in eine Capillare verengert und das Quecksilber erst beim Überfließen (Fig. 154) über die Capillare die Gaszuleitungsrohre bei *E* schließt, wie es bei dem *Reichertschen* Thermoregulator der Fall ist. Dieser Regulator hat außerdem den Vorzug, daß die Einstellung nicht durch die verhältnismäßig grobe Verschiebung des Gaszuleitungsrohres wie bei Fig. 155, sondern durch Veränderung der Quecksilberstandhöhe, welche mit Vorschrauben oder Zurückdrehen einer seitlichen Stell-schraube *D* erzielt wird, herbeizuführen ist. Auch die zur Unterhaltung

der Notflamme nötige Gasmenge ist infolge des Ersatzes des Notloches durch eine Rohr-Gasumführung mit Hahn (C) regulierbar.

Die empfindlichsten Thermoregulatoren enthalten als Regulierflüssigkeit eine leicht siedende Flüssigkeit, Äther, Alkohol od. dgl. im Regulierraum. Auch Quecksilber wird eingefüllt, aber es dient lediglich dazu, die gebildeten Äther- oder Alkoholdämpfe am Entweichen zu hindern und ihren Druck zwecks Gasabdrosselung zur Geltung zu bringen (Fig. 156). Der Regulierraum ist zwischen *R* und *U* durch eine

Fig. 156.

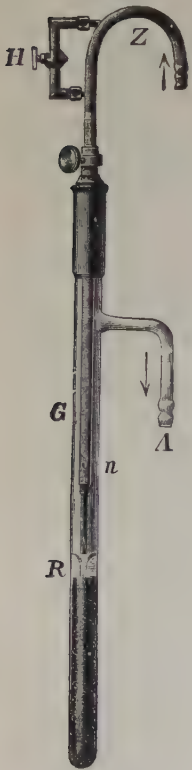
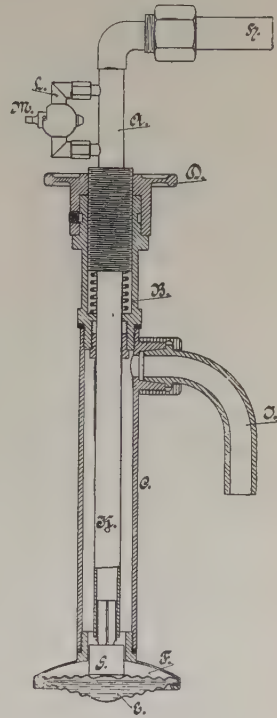


Fig. 157.



Fig. 158.



horizontale Glasplatte in zwei Abteilungen geschieden. Die Platte ist zentral von einer Glasröhre durchbohrt, welche gerade oder in Spiralform (*S*) bis zum Boden des Gefäßes herabführt und dort offen endet. Sie stellt die Verbindung zwischen beiden Abteilungen her. Der Vorteil der Spiralverbindung vor der gerade geführten Glasröhre soll darin bestehen, daß das in ihr emporsteigende Quecksilber wie die Schraube in einem Schraubengewinde stetig und allmählich steigt und fällt, während bei gerader Röhre die sprungweise Ausdehnung des Quecksilbers in den verschiedenen Temperaturbreiten eine ruckweise Bewegung des Quecksilberspiegels und entsprechend eine bruske Ver-

schließung der Gaszufuhr und plötzliche Temperaturschwankungen im Brutraum herbeiführen kann. Die gerade Steigrohr bietet demgegenüber einen gewissen Vorteil insofern, als man unter Benutzung eines Capillartrichters zur Einfüllung imstande ist, selbst Regulierungen der Füllung vorzunehmen. Bei der Füllung des Regulators wird zunächst die Regulierflüssigkeit eingegossen und dann Quecksilber aufgefüllt. Durch sein größeres spezifisches Gewicht nimmt das Quecksilber den Boden des Gefäßes ein und hebt und preßt den Äther samt der eingeschlossenen Luft an die Decke der unteren Abteilung bei *R* zusammen. Wird nun der Regulator, nachdem das Abdrosselungsrohr für die Gaszufuhr *Z* eingeschraubt ist, in höhere Temperatur, z. B. in das Wasser des Brutschrankes eingehängt, so dehnt sich der Äther energisch aus, die Ätherdämpfe schieben das Quecksilber nach unten und durch die Capillare in den oberen Teil des Regulierraums, wobei der Verschluß der schlitzförmigen Gaszufuhröffnung bei *U* erfolgt. Für die Notflamme strömt Gas von *Z* durch *H* in eine Röhre *G*, die oben und unten ringsum angelötet *Z—U* mantelförmig umgibt und nur bei *n* eine kleine Ausströmungsöffnung besitzt. Bei *A* findet die Ableitung des Gases zum Brenner statt. Der Regulator ist nur bis etwa 50° brauchbar, bei größerer Wärme würde der Druck, den das Quecksilber dem Ausdehnungsbestreben der Ätherdämpfe entgegenzusetzen vermag, nicht mehr ausreichen, das Quecksilber würde durch den Ätherdampf durch das Spiralsteigrohr herausgeschleudert und der Regulator unbrauchbar. In einem neuen Modell (Fig. 157) hat es die Firma Lautenschläger verstanden, das Durchbrechen des Quecksilbers auch bei höheren Temperaturen dadurch zu vermeiden, daß sie die untere Abteilung des Regulierraumes wesentlich verkleinerte und das Abschlußquecksilber fast vollständig in der Steigspirale und dem oberen Raum des Regulierraumes unterbrachte. Hierdurch wird die Höhe der auf der Regulierflüssigkeit lastenden Quecksilbersäule so groß, daß auch bei Temperaturen über 100° der Dampfdruck des Äthers nicht ausreicht, die Quecksilbersäule herauszuschleudern: der Regulator wird dadurch auch zur Regelung höherer Temperaturgrade verwendbar.

Den Vorteil der Handlichkeit und Widerstandsfähigkeit gegen äußere Insulte bietet ein Metallkapselregulator von *Lautenschläger* (Fig. 158). Bei *E* befindet sich eine Metallkapsel mit Regulierflüssigkeit gefüllt. Die Kapsel ist so gebaut, daß ihre Volumensänderung bei Erwärmung oder Abkühlung durch Bewegung der oberen Deckelmembran *F* zum Ausdruck kommt. Diese Bewegung wird auf das Ventil *G* übertragen, welches den Hauptgasstrom, welcher von *H* über *K* nach *J* geht, öffnet und schließt. Eine durch den Hahn *M* regulierbare Nebenleitung *L* liefert das Gas zur Unterhaltung der Notflamme. Die Einstellung erfolgt durch Verschiebung der Röhre *A—K* (in größere oder geringere Entfernung) gegen das Ventil *G*, welches ähnlich der Quecksilberoberfläche bei den Quecksilberregulatoren wirkt.

seits eine Menge von Quecksilber luftfrei auf, die genügend ist, bei Gleichgewicht den *U*-Schenkel etwa 5 cm hoch zu füllen. Verbringt man nunmehr den Regulator in Wasser von 37°, so zieht sich die Chlorcalciumlösung zusammen und reicht nur noch bis zu der kugeligen Auftreibung des Reguliergefäßes. Es wird jetzt noch soviel Quecksilber nachgefüllt, bis rechts die Höhe des Hahnes, links der Boden der Erweiterung, in welcher die Gasabdrosselung erfolgen soll, erreicht ist. Der Hahn wird geschlossen und die Gaszuleitungsröhre so weit eingeschoben, daß bei 37° eben die Ausströmungsöffnung vollständig abgeschlossen wird und nur noch die durch das Notloch strömende Gasmenge das Brennen der Flamme unterhält. Sinkt jetzt die Temperatur des Wassers, so weicht das Chlorcalcium und mit ihm der Quecksilberfaden links zurück und die Flamme brennt wieder größer u. s. w. Die feinere Einstellung kann durch Ablassen von Quecksilber durch den Hahn sowie durch Veränderung der Stellung der Gaszuleitungsröhre erfolgen. Wesentlich einfacher ist die Bedienung von Fig. 161. Die Füllung geschieht durch Eingießen der CaCl_2 -Lösung durch *h* nach *a*, welches durch ein Schliffstück *c* mit dem oberen Hahnaufsatz verbunden ist. In das U-Rohr (*d*) gibt man Quecksilber. Bei geöffnetem Hahn wird nun der Regulator in Wasser von der gewünschten Wärme eingesetzt und sobald es vollkommen durchgewärmt ist, der Hahn (*z*) geschlossen; das Gaszuleitungsrrohr *l* wird mit der leichtgehenden Mikrometerschraube *k* mittels Zahn und Trieb bis zur völligen Abdrosselung der Hauptgaszufuhr vorgeschoben. Durch eine federnde Metallgarnitur *n* ist ein festes sicheres Zusammenhalten der Schliffflächen bei *c* gesichert. Bei *f* befindet sich das Notloch, *m* und *l* sind die Verbindungsgewinde zur Gasleitung. Die Genauigkeit dieser Regulatoren ist bei richtiger Füllung sehr gut, sie halten die Temperatur bis auf $\frac{1}{10}^\circ$ genau konstant.

Auch die Ausdehnung und Zusammenziehung fester Körper kann zur Regulierung von Thermostaten sehr wohl Verwendung finden. Als Typen seien hier der *Leitz-Bergmannsche* Metallregulator sowie der von *Altmann* hergestellte beschrieben (Fig. 162, 163, 164). Bei *F* (cf. Fig. 163) findet sich eine Metallfeder, die ihre Bewegung bei wechselnder Erwärmung mittels eines Winkelhebels *W* in Verschiebung einer Stange *G* äußert, die ihrerseits durch einen Metallkegel *H* den Hauptgasunlauf des Thermoregulators von *A* nach *B* mehr weniger zuschiebt. Bei *c* findet sich das Gasnotloch, welches durch die Schraube *C* in seiner Weite verändert werden kann. Die Stellschraube *D* gestattet durch Abwärtsbewegung des gesamten Federsystems den Kegel *H* von der Gasableitungsröhre *B* zu entfernen, umgekehrt zu nähern und bewirkt so die feinere Einstellung. Die ganze Reguliervorrichtung ist durch eine gasdichte Metallröhre umschlossen. Der Regulator hält die Temperatur auf $\frac{1}{10}^\circ$ konstant, ist durch Vermeidung jeder Glasarmatur fast unzerbrechlich und zudem leicht reparierbar.

Bei dem Metallthermoregulator nach *Altmann* (Fig. 164) wird der U-förmig gebogene Bimetallstreifen *A* in den zu regulierenden Raum bzw. Flüssigkeit direkt eingehängt. Er dehnt sich, je nach der Temperatur, verschieden aus und überträgt diese Bewegung auf den Hebelarm *b*, an welchem eine zugespitzte Schraube *c* befestigt ist. Diese in der Länge beliebig einstellbare Schraube drückt gegen den Hebel *d* des Gaszufuhrventils und schließt dadurch die Gaszufuhr ab. Das Gas strömt durch die Röhre *l* in die Gaskammer *k* und unter Passieren des Ventils durch *m* zu der Gasflamme. Bei *o* befindet sich eine Schraube zur Regulierung der Notflamme, die bei geschlossenem Ventil das Brennen der Heizflamme unterhält. Auf dem Schraubenkopf bei *e*

Fig. 162.

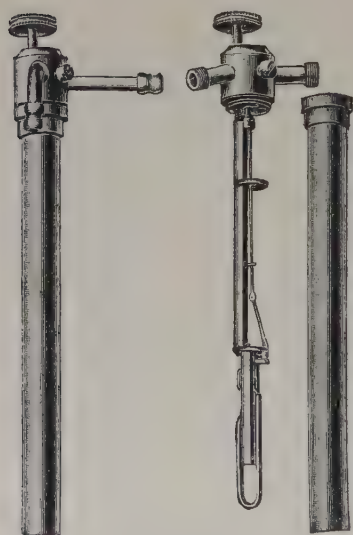
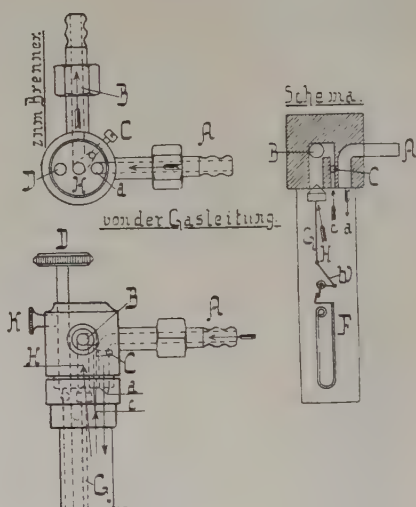


Fig. 163.



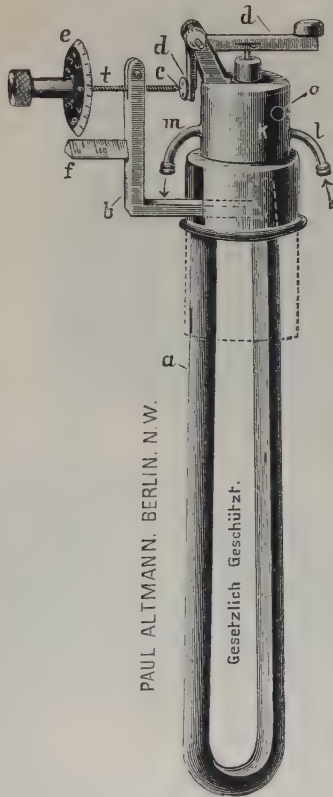
befindet sich eine feine Teilung, welche in Verbindung mit der Millimeterteilung des linealförmigen Aufsatzstückes *f* eine mikrometrische Präzisionseinstellung gestattet. Der Regulator ist sofort gebrauchsfertig und die Einstellung auf jede beliebige Temperatur ist durch Einhängen der Regulierfeder in eine entsprechend warme Flüssigkeit und Bewegung der Schraube *f* bis zum völligen Ventilverschluß sehr rasch auf $\frac{1}{10}^{\circ}$ genau durchführbar.

Im Gegensatz zu den Thermoregulatoren für Gasheizung können die für Regulierung von Petroleumheizung bestimmten nicht durch Veränderung der Flammenhöhe die Wärmeentwicklung beeinflussen, da jede Petroleumlampe nur bei einer bestimmten Höhe des überstehenden Teiles vom Lampendocht und nur bei einer bestimmten (minimalen) Luftzufuhr eine brauchbare und gleichmäßige Wärmequelle abgibt. Die Konstanzhaltung eines petroleumgeheizten Brutschrankes

erfolgt daher entweder dadurch, daß die Heizlampe bei Erreichung einer bestimmten Temperatur vollständig entfernt wird oder dadurch, daß die Heizgase an dem Brutschrank vorbeigeleitet werden, oder endlich nach einem neuen Modell von *Lautenschläger* in der Weise, daß der Lampe im Übermaß Luft zugeführt und dadurch ihr Heizeffekt abgeschwächt wird.

Das erstgenannte Prinzip wird heute von keiner mir bekannten Firma mehr durchgeführt, es scheint demnach sich als unpraktisch

Fig. 164.



erwiesen zu haben. Die Petroleumlampe stand dabei auf einem Schlittenapparat, der durch elektromagnetische Kraft bei Erreichung einer bestimmten Temperatur aus der Heizstellung unter dem Brutschrank herausgefahren wurde.

Viel benutzt wird heute der Petroleumbrutschrank, wie er in Fig. 166 dargestellt ist. Aus der Abbildung geht auch die von den Gasbrutschränken in einigen Punkten abweichende Bauart leichtverständlich hervor.

Den Wasserraum w durchzieht an seinem unteren Boden eine U-förmig gekrümmte Röhre cc , an deren beiden offenen Enden mittels zweier Rohransätze der Blechkasten m seitlich am Apparat angesteckt und festgeschraubt ist. Senkrecht in diesem Kasten befindet sich der blecherne Schornstein SS , unter dem die Petroleumheizflamme so aufgestellt ist, daß ihr Zylinderende in den Schornstein hineinragt. Der

Fig. 145.



Brutkasten besitzt mit Rücksicht auf die geringere Heizkraft einer Petroleumlampe eine besonders gute Isolierung x , die von *Altmann* aus einem körnigen Spezialisolierrmaterial ausgeführt wird.

Der Innenraum besitzt eine Vorrichtung für Ventilation und Einführung von feuchter Luft. Zu diesem Zweck sind Boden und Decke bei o und u durchbrochen: die Luft kann von unten her ein- und durch regulierbare Öffnungen bei o abstreichen. Dabei muß sie bei d eine Leinwandmembran passieren, die nach Bedarf durch Wasser, welches von dem umgekehrten Erlenmeyerkolben b zufließt, feucht gehalten wird.

Die Regulierung der Erwärmung findet durch einen Membranregulator statt (cf. Fig. 167).

Fig. 166.

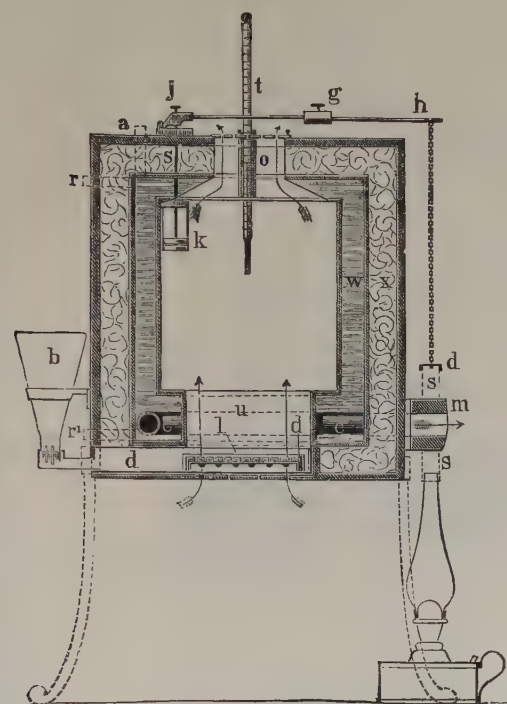
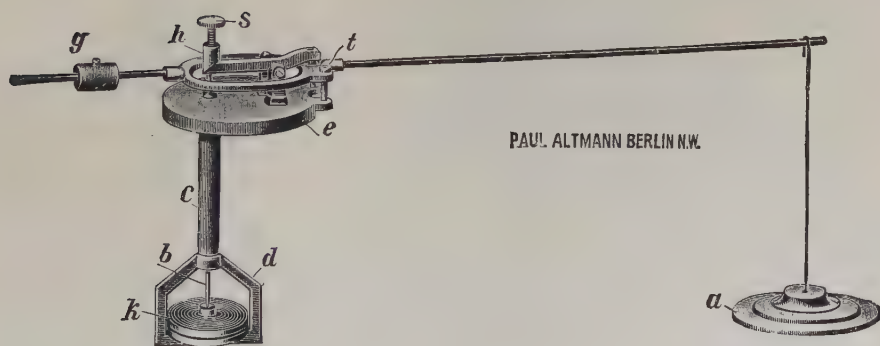


Fig. 167.



Neue automatische Reguliervorrichtung bei Thermostaten mit Petroleumheizung.

Die Kapsel *k* ist mit Äther gefüllt und im Innenraum des Brutschrankes im Metallrahmen *d* befestigt. Ihre Volumenänderung bei verschiedenen Temperaturen kann sich nur in einer Hebung oder Senkung ihrer oberen konvexen, sehr dünnen elastischen Metall-

membran äußern. Diese Bewegung wird auf den Führungsstift *b* übertragen, welcher durch das Verbindungsrohr *c* hindurch mit der auf dem Sockel des Brutschrankes befindlichen Regulierschraube *S* in Verbindung steht. Die Membranbewegung wirkt dadurch auf *S* und diese wiederum durch den Übertragungshebel *h* auf den Regulierhebel *t*. Ersterer ist zwischen zwei Schrauben, letzterer auf zwei Stiften, welche sich auf der Reguliertscheibe *e* befinden, gelagert. Die kleinste Bewegung der Membran ruft auch bei schwachem Druck gegen *h*—*S*

Fig. 166.

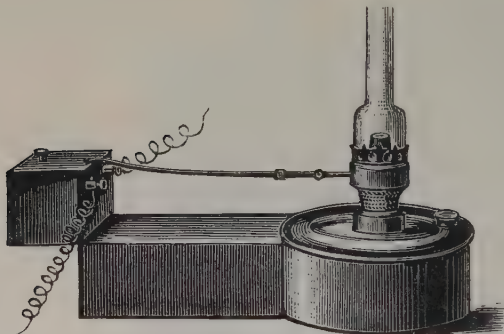
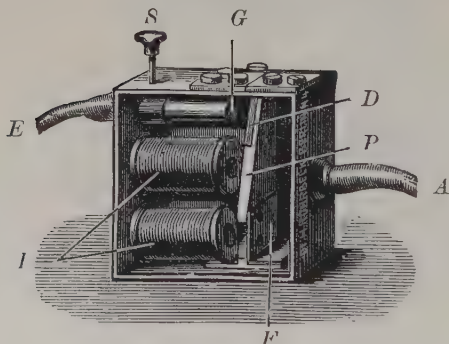


Fig. 169.



Fig. 170.



einen lebhaften Ausschlag der Platte *a* hervor, da das Gewicht des langen Hebels *t* durch ein Gegengewicht *g* fast vollkommen ausgeschaltet werden kann. Die Platte *a* (gleich *d* in Fig. 166) dient zum wechselnden Verschluss des Schornsteins *S*. Liegt die Platte auf, so müssen alle Heizgase *CC* passieren und die Temperatur des Wassers *w* erhöhen, schwebt die Platte frei über *S*, so entweichen alle Heizgase ungenutzt und der Brutschrank kühlt sich ab. Der Regulator wird mit Hilfe der Stellschraube *s* so eingesetzt, daß bei Erreichung der gewünschten Temperatur im Innern die Platte *d* sich eben von dem Schornstein *S* abhebt, die weitere Konstanthaltung findet dann automatisch statt.

Neuere Petroleumbrutschränke werden vielfach auch so gebaut, daß sie jederzeit leicht durch Unterbringen einer Bunsenflamme und Einschaltung eines Gasregulators auch für Gasheizung einrichtbar sind. Man muß dann allerdings den Boden als Heizfläche konstruieren und auf die oben beschriebene Feuchtluftventilation verzichten.

Ein besonderer Regulator für Petroleumheizung wird von *Lautenschläger* gebaut (cf. Fig. 168).

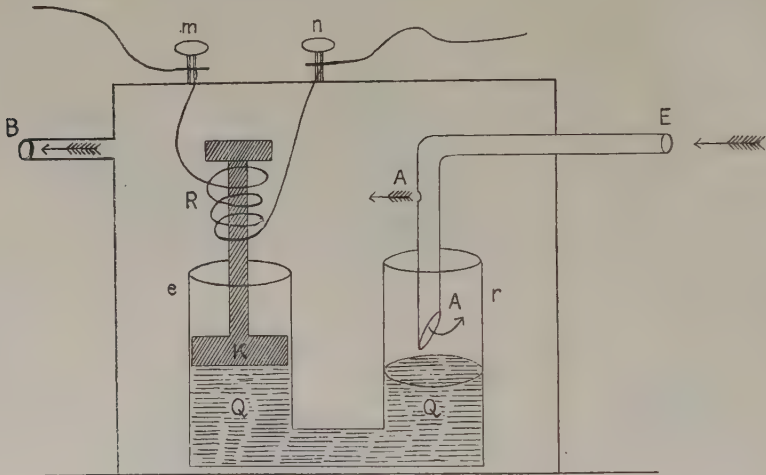
In den Wasserraum des Brutschrankes ist ein Thermometer eingehangen (Beschreibung s. unten), das bei bestimmter Temperatur einen elektrischen Stromkreis schließt. Dieser betätigt beim Schluß den in dem Kästchen links von der Lampe befindlichen Elektromagneten und hebt dabei mittels eines langen ausbalanzierten Hebelarmes die äußere der beiden Messingröhren, welche den Lampendocht einschließen in die Höhe. Diese Hebung bringt praktisch denselben Effekt hervor, als wenn der Docht der Petroleumlampe herabgeschraubt würde: die Brennfläche des Dochtes wird kleiner, die Heizkraft der Lampe wird vermindert, die Temperatur des Brutraumes sinkt, der Strom wird unterbrochen, die äußere Dochtführung sinkt in ihre normale Lage zurück und das automatische Spiel hält die Temperatur des Brutschrankes konstant.

Ähnlich wie die letztbeschriebene Regulierung von Petroleumheizungen findet auch die elektrische Regulierung von Gasbrutschränken statt. Das Kontaktthermometer ist im allgemeinen wie ein normales Thermometer konstruiert, nur ist (Fig. 169) bei *C* ein in den Steigraum des Quecksilbers vorspringender Glaszahn eingeschmolzen und ebenso zwei Elektroden *a* und *b* vorgesehen, die durch die Klemmschrauben *a* und *b* in die Leitung eingeschaltet werden. Das Thermometer kann für Stromschluß und (durch Relaiszwischenhaltung) auch für Unterbrechung bei beliebiger Temperatur Verwendung finden. Soll dasselbe bei 37° schließen, so läßt man das Thermometer in warmem Wasser genau bis auf 37° steigen und bringt es jetzt rasch zur Abkühlung in kaltes Wasser. Das Quecksilber zieht sich zusammen, aber nur der untere Teil des Fadens sinkt in das Reservoir zurück, während der obere an dem Glaszahn zurückgehalten wird und von diesem bis zur Zahl 37 stehen bleibt. Nunmehr ist das Thermometer zum Stromschluß bei 37° vorbereitet: steigt die Temperatur des Wassers im Brutschrank, so steigt auch der Quecksilberfaden, berührt zunächst dabei den Poldraht *b* und unmittelbar, bevor das Wasser die Wärme von 37° angenommen hat, auch den Poldraht *a*, denn der Glaszahn befindet sich unmittelbar über demselben. Durch die Verbindung der beiden Poldrähte wird Stromschluß erzeugt, welcher durch den Gasschließer (Fig. 170) die Heizflamme bis auf eine kleine Stichflamme auslöscht; die Wärme des Brutwassers sinkt, mit ihr der Quecksilberfaden im Thermometer, der Stromkreis wird dadurch wieder unterbrochen, die Gasflamme wird wieder groß u. s. w. Das Kontaktthermometer kann in der

Kälte wie ein Maximalthermometer zurückgeschüttelt und darauf für Stromschluß bei beliebiger Temperatur eingestellt werden. Der Bau des elektrischen Gasabschließers ist aus Fig. 170 ersichtlich.

In den gasdichten Metallkasten strömt bei *E* das Gas ein, passiert eine bewegliche Scheidewand *FPD* und gelangt durch *A* zur Heizflamme. *J* sind Induktionsspulen, die ihren im Innern liegenden Eisenkern magnetisieren, sobald sie von einem elektrischen Strom durchflossen werden. Die Stromzuleitung zu dem Gasabschließer erfolgt durch die auf dem Deckel sichtbaren Klemmschrauben. Wird der Kern magnetisch, so zieht er die in der Feder *F* bewegliche Metallplatte *P* an und verschließt durch deren Dichtungsscheibe *D* die Gaseinströmungs-

Fig. 171.



Elektrischer Gasabschließer nach F. und M. Lavtenschläger.

öffnung *G*. *S* ist eine Regulierschraube, durch welche eine Nebenleitung für die Notflamme auf gewünschte Größe eingestellt werden kann.

Der Bau eines sehr genau arbeitenden Gasabschließers, welcher ebenfalls durch ein in den Wasserraum des Brutschrankes eingehängtes Kontaktthermometer betätigt wird, ist aus nebenstehender Darstellung (Fig. 171) ersichtlich. In einem gasdicht schließenden Metallkasten, der mit einem Gaszuleitungsrohr *E* und einem Gasableitungsrohr *B* versehen ist, befindet sich ein U-förmiges Glasgefäß, das zur Hälfte mit Quecksilber gefüllt ist. In dem Schenkel *r* endet über dem Quecksilberpiegel der rechtwinklig abgebogene Schenkel des Rohres *E*, an dem sich seitlich die Gasausströmung für die Notflamme *A*, und bei *A* die schrägabgeschnittene Hauptgasöffnung befindet. In *I* ist ein Metallkolben eingepaßt, der durch einen Relais *R* bei Stromschluß auf das Quecksilber gepreßt wird. Hierdurch wird das Quecksilber nach dem

Schenkel r verdrängt und schließt hier in der bekannten Weise die Hauptgaszufuhr ab. Die Polschrauben m und n dienen zur Verbindung mit einem elektrischen Stromkreis, der seinerseits durch Schluß im Kontaktthermometer des Brutschrankes in Tätigkeit gesetzt wird.

Die elektrische Regulierung für Brutschränke mit Gasheizung ist in der Einrichtung (Kontaktthermometer und Gasabschließer) etwas umständlich, liefert aber sehr gute Resultate. Wesentlich einfacher ist die Regulierung eines elektrisch geheizten Brutschrankes, da hier nur eine Vorrichtung, ein Thermoregulator, eingeschaltet zu werden braucht, der bei einer bestimmten Temperatur den Strom der Heizkörper unterbricht. (Auf Stromverminderungsapparate will ich hier nicht eingehen, da sie unwirtschaftlich sind und keine besseren, meist schlechtere Ergebnisse bezüglich Konstanthaltung der Temperatur im Thermostaten liefern.) Das Prinzip der Stromunterbrechung ist aus Fig. 172 ersichtlich. Als Regulierflüssigkeit dient Äther. Dieser schiebt bei der Ausdehnung durch die Glasspirale (cf. S. 775) Quecksilber in den oberen Teil des Glasrohres. Der Quecksilberspiegel hebt bei weiterem Steigen den Schwimmer K , welcher mit dem Hebel H in Verbindung steht und durch diesen bei U den Stromkreis unterbricht. Die Einstellung geschieht grob durch Veränderung der Höhenstellung von K , fein durch die Schraube S .

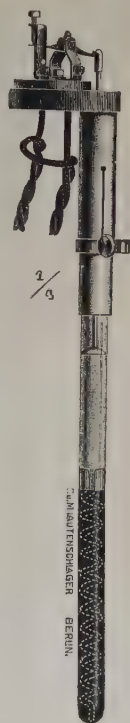
Einen Thermoregulator „Femel“ für elektrische Heizung (cf. Fig. 173), der sich in der Praxis als Präzisionsinstrument gut bewährt haben soll, bringt neuerdings die Firma F. & M. Lautenschläger G. m. b. H., Berlin N. 39, in den Handel.

Dieser Thermoregulator besteht aus einem röhrenförmigen Unterteil A mit eingeschlossener Flüssigkeit, die bei ihrer Ausdehnung auf eine elastische Membran einwirkt. Die hohe Veränderung der Membran wird auf das Oberteil B mit hebelartiger Übersetzung übertragen und die Stromzufuhr durch einen Platinkontakt F geöffnet oder geschlossen. Die Regulierschraube C ist durch eine Feststellschraube D fixierbar. E und E_1 sind die Kontaktschrauben für den Stromanschluß.

Der Thermoregulator wird mit seinem Unterteil in den Wasserraum des betreffenden Apparates eingesetzt. Eine Leitungsschnur ist getrennt und die beiden Enden der getrennten Schnur an die Kontaktschrauben E und E_1 befestigt.

Beim Anheizen des Apparates ist die Einstellschraube C so weit nach links zu drehen, bis der Platinstift die Unterlage berührt und der Stromkreis geschlossen wird. Ist die gewünschte Temperatur erreicht, so ist die Einstellschraube so weit nach rechts zu drehen, bis der Platinstift die Unterlage verläßt und mit geringer Funkenbildung den Heiz-

Fig. 172.



strom unterbricht. Die automatische Regulierung der Heizung geschieht nun in der Weise, daß bei steigender Erwärmung der Hebel mit dem Kontaktstift gehoben wird und die Heizung ausschaltet, während bei Abkühlung des Apparates der Hebel zurückgeht und den Stromkreis von neuem schließt.

Fig. 173.

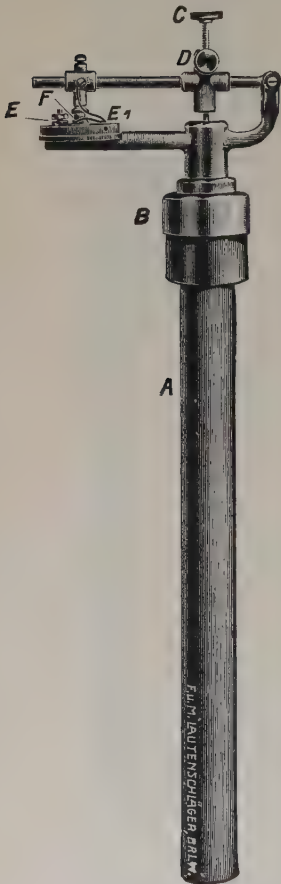


Fig. 174.

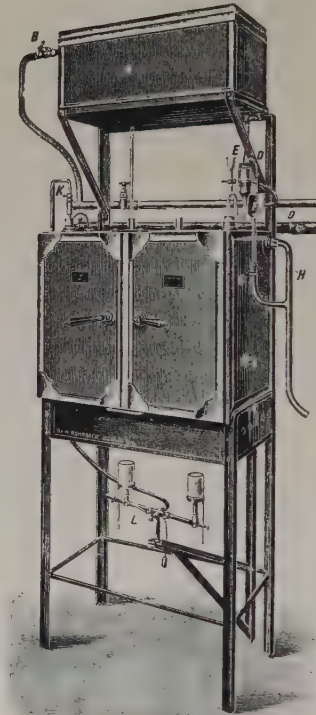
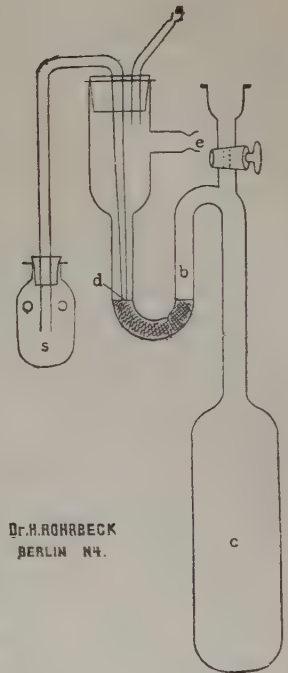


Fig. 175.



Die Höchstgrenze der einzustellenden Temperatur ist einerseits durch die Heizquelle und andererseits durch die Veränderung der Metallmembran bedingt.

Der Menge des durch den Thermoregulator zu führenden Stromes sind Grenzen gesetzt, die in der Funkenbildung beim Unterbrechen des Stromes liegen und bei Gleichstrom ca. 250 Watt, bei Wechselstrom 400 Watt betragen.

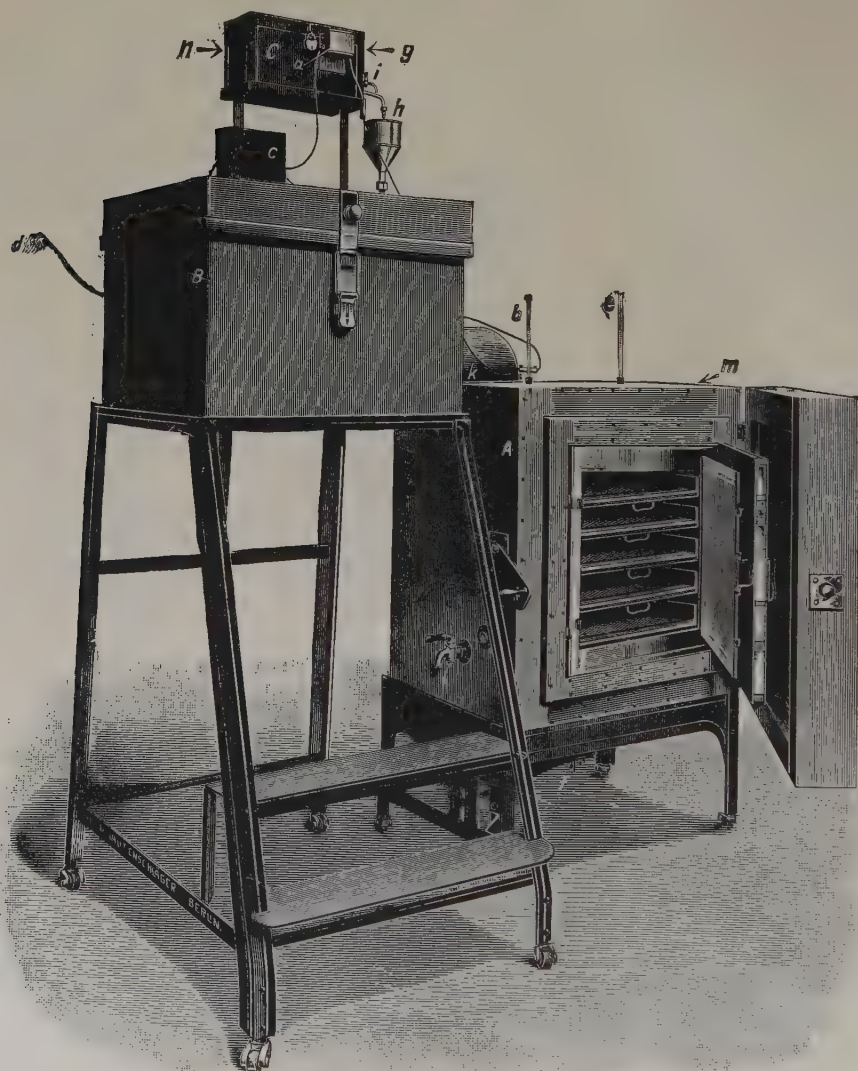
Wenn auch die Temperaturhaltung eines Brutschrankes von der Zuverlässigkeit des gesamten Materials und vor allem von der Genauigkeit des eingeschalteten Thermoregulators abhängig ist, so darf eine

ständige Kontrolle dennoch nicht vernachlässigt werden. Es wird, deswegen für gewöhnlich je ein exaktes Thermometer sowohl in den Wasserraum als auch in den eigentlichen Brutraum eingehängt und die Temperatur in bestimmten Zwischenräumen abgelesen und notiert. In größeren Instituten empfiehlt es sich, mittels Fernthermometer, deren wesentlichen Bestandteil ein empfindliches Thermoelement darstellt, von einer Zentrale aus regelmäßig alle Brutschränke zu kontrollieren. In dieser Zentrale bringt man neuerdings auch eine Alarmvorrichtung an, welche ertönt, sobald an einem Brutschrank die Flamme erlischt und seine Temperatur unter einen bestimmten Punkt herabsinkt. Die gleiche Vorrichtung läßt sich natürlich für ein Temperaturmaximum der Brutschränke konstruieren. Durch derartige Einrichtungen kann die Sicherheit von Versuchen ganz wesentlich erhöht und dem Verlust von wertvollen Kulturen vorgebeugt werden.

Alle bisher beschriebenen Brutschränke müssen versagen, sobald es sich um Erzielung von konstanten Temperaturen handelt, die bald über, bald unter der herrschenden Zimmertemperatur liegen. Besonders eine konstante Temperatur von 22° ist häufig erforderlich, da diese den besten Wärmegrad für Bebrütung von Gelatinekulturen darstellt. Jeder „ 22° -Brutschrank“ ist bei dauerndem Betrieb auf eine Kälte- und eine Wärmequelle angewiesen. Ein einfaches Modell desselben ist in Fig. 174 dargestellt. Ein normal gebauter Brutschrank, wie er für Gasheizung benutzt wird, besitzt auf der linken Seite bei *K* einen empfindlichen Thermoregulator, der die Gaszufuhr der Flammen *L* abdrosselt, sobald die Temperatur auf 22° gestiegen ist (Winterheizung). Auf der rechten Seite bei *EDFG* befindet sich ein zweiter Thermoregulator, der bei Zimmertemperaturen über 22° den Brutschrank durch Zuleitung von Kalt- eventuell Eiswasser bis auf 22° abkühlt. Der Wasservorrat befindet sich im Kasten *A*, welcher wenn möglich direkt mit der Wasserleitung verbunden und durch Wirkung eines Schwimmventils auf gleicher Füllung gehalten wird. Bei großer Hitze werden in den Kasten *A* noch Eisstücke eingelegt. Die Einrichtung des Regulators für die Kaltwasserzuführung zum Brutschrank ist auf Fig. 175 dargestellt. Bei *a* fließt das Kaltwasser ein und, solange die Temperatur des Brutschrankes unter dem zulässigen Maximum bleibt, durch den Heber *s* nach einem Abflußrohr ab. Der Heberausfluß ist von einem Hebergefaß mit hochliegenden seitlichen Ausflußöffnungen umgeben, damit bei unvermeidbaren kleinen vorübergehenden Störungen im Wasserzufluß der Heber nicht gleich leerläuft. *C* enthält die Regulierflüssigkeit mit hohem Siedepunkt. Analog dem *Ostwaldschen* Thermoregulator treibt sie bei Ausdehnung den Quecksilberfaden *b—d* vor sich her und drosselt bei einer bestimmten Temperatur den Wasserheber bei *d* ab. Das von *a* ständig zufließende Wasser kann nicht mehr durch *s* abfließen, steigt in dem Hebervorraum höher an und fließt durch *e* so lange in den Wasserraum des Brutschrankes, bis dessen

Temperatur wieder auf 22° gesunken ist, die Regulierflüssigkeit *c* und mit ihr der Quecksilberfaden zurückgesunken und damit der Wasser- ausfluß durch den Heber *s* wieder freigeworden ist.

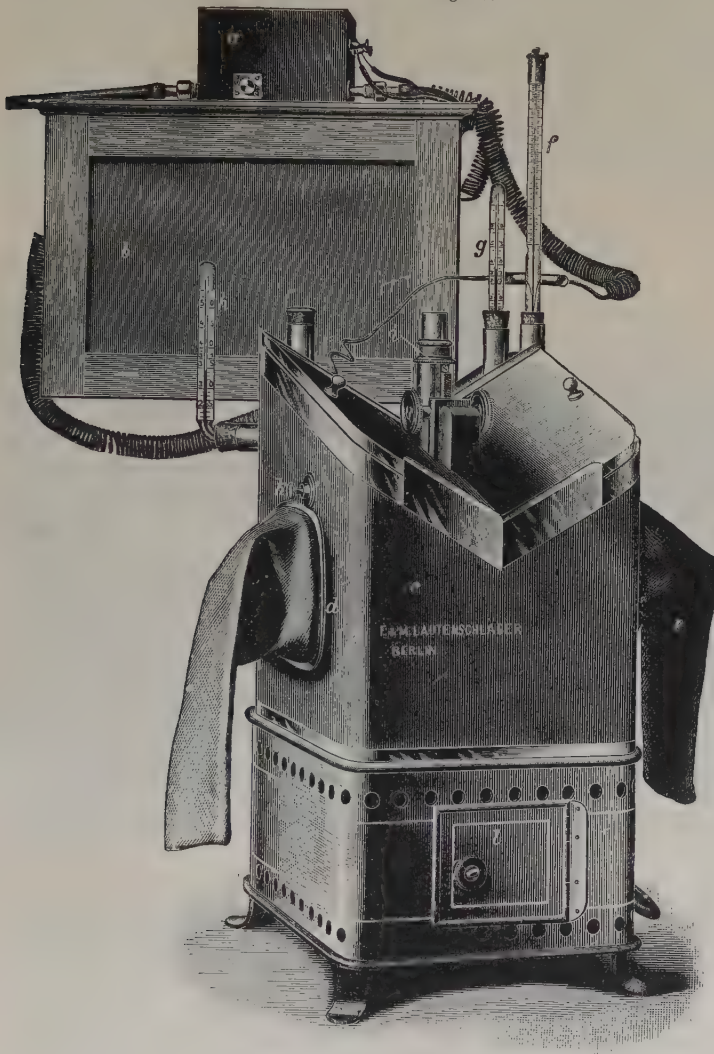
Fig. 176.



Für Temperaturen von $+3$ bis -12° ist ein von *Hertwich* angegebener und von *Lautenschläger* gebauter „eiskalter Brutschrank“ bestimmt (Fig. 176). Der Brutschrank *A* ist in einen besonders gut isolierten Mantel eingebaut, eine Wärmequelle kann entbehrt werden, während für ständige Eiswasserkühlung Sorge getragen wird. Der Eisbehälter *B*,

durch welchen das Kühlwasser durchfließt, findet sich, ebenfalls mit einem Isoliermantel umgeben, neben dem Brutschrank, über ihm ein kleines Wasserreservoir *C*, dessen Füllung mit Schwimmkugelhahn auf

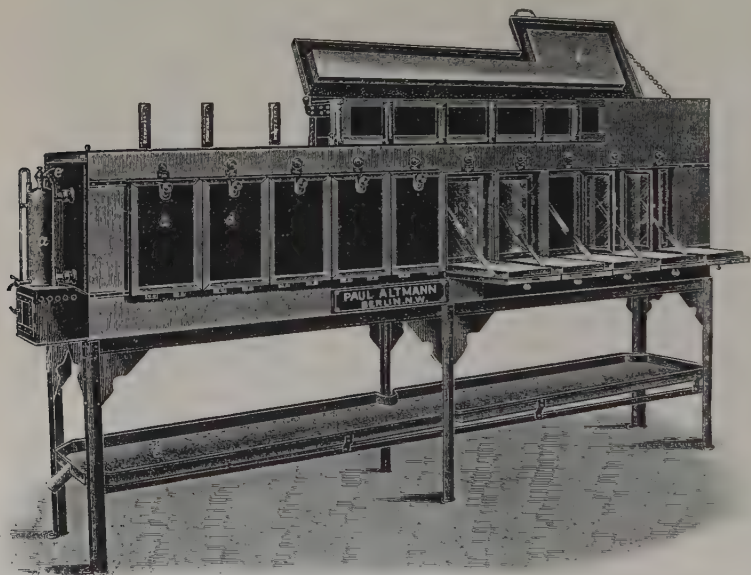
Fig. 177.



gleichem Niveau gehalten wird. Die Öffnung und Schließung des Eiswasserzuflusses zum Brutschrank geschieht auf elektrischem Wege: das Kontaktthermometer *b* schließt ein Relais *c*, das direkt mit der Stromleitung bei *d* in Verbindung steht, deswegen keiner Erneuerung der Kraftquelle bedarf, und die Öffnung und Schließung des Wasserventils bewirkt.

Eine Abhandlung über Thermostaten und Thermoregulatoren könnte unvollständig genannt werden, wenn nur die in den meisten bakteriologischen Laboratorien üblichen und bewährten Formen ausführlich gewürdigt wären. Besondere Zwecke erfordern besondere Mittel; für bestimmte praktische Verhältnisse, für bakteriologische und biologische Spezialuntersuchungen wurden Einzeltypen von Thermostaten herausgebildet, die zwar keine allgemeine Bedeutung für das bakteriologische Laboratorium beanspruchen dürfen, für ihren Sonderzweck aber große Vorteile bieten, ja praktisch unentbehrlich sein können. Als wichtigste Formen sind die nachfolgenden zu erwähnen:

Fig. 178.



Der Mikroskopbrutschrank nach *Plehn-Nuttall* dient dazu, mikroskopische Objekte bei konstanter Temperatur zu beobachten, Leben und Wachstum von Bakterien und Protozoen mit dem Auge zu verfolgen (Fig. 177). Er besitzt einen doppelwandigen Wasserbehälter aus Kupfer (*c*), in welchen das Mikroskop (*i*) nach Ausschieben der beiden schrägen Dachflächen eingesetzt werden kann. Die Dachflächen gestatten, durch eine Filzplattenarmierung den Tubus des Mikroskops nach außen abzudichten. Das Mikroskop empfängt sein Licht durch eine Glasscheibe, die in der Vorderwand des Brutschrankes eingelassen ist. Die Bewegung des Tubus kann von außen erfolgen, während man zur Bedienung des Präparates in zwei seitliche Gummiärmel (*d* und *e*) einfaßt, in denen leicht zu öffnende Türen nach dem Innern führen. Die Heizung des Brutschrankes erfolgt durch Gasflammen von unten und ist durch die Tür (*l*) zugänglich. Die Regulierung erfolgt elektrisch:

f ist das Kontaktthermometer, a der Gasabschließer, b der Behälter für die Akkumulatoren, welche die elektrische Energie liefern.

Serienbrutschrank für bakteriologisch - biologische Versuche. Er enthält 10 vollkommen für sich verschließbare Brutschränkabteilungen, von denen in jeder eine andere Temperatur, stufenweise verschieden, konstantgehalten wird. Er wird in zwei Ausführungen für eine Temperaturreihe von 22—42° und für eine solche von 1—22° geliefert. Jeder Apparat ersetzt also gleichzeitig 10 Brutschränke mit verschiedenen Temperaturen und wird mit Vorteil verwendet, wenn es sich darum handelt, vergleichende

Fig. 179.

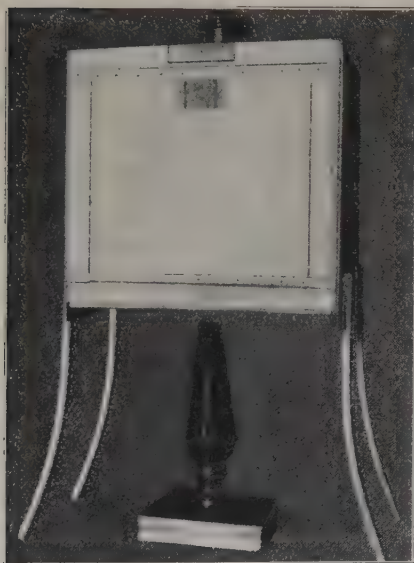
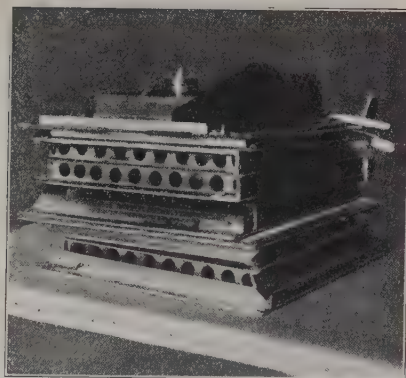


Fig. 180.

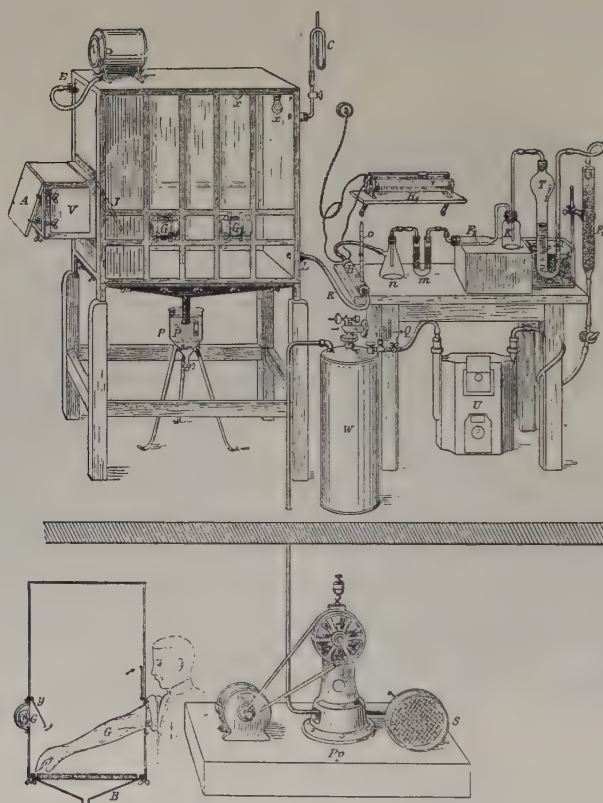


Vegetationsversuche anzustellen, Wachstumoptimum zu bestimmen, sowie Virulenzabschwächungen oder -erhöhungen auf kulturellem Wege zu erreichen (Fig. 178). Die Einzelabteilungen dd besitzen jeweils eine nach vorn ausklappbare, isolierte Tür und besonderes Thermometer. Alle sind in denselben gemeinschaftlichen Isolierraum eingebaut; die Temperaturabstufungen im Innern der einzelnen Fächer werden dadurch erzielt, daß auf der einen Seite (links in der Figur) ein Warmwasserkessel a mit Thermoregulator e und Gasheizung angebaut ist, welcher dem Gesamtraum von dieser Seite her ständig eine bestimmte Wärmemenge zuführt, während auf der entgegengesetzten Seite des Schrankes (Fig. 178, rechts oben) ein Eiskasten aufgesetzt ist, dessen Schmelzwasser dauernd der rechten Seite des Brutschrankes Kälte zuführt. Der Wärmeausgleich im Innern findet durch Wärmeleitung

statt und die Kunst des Konstrukteurs besteht darin, Material und Abmessungen so zu wählen, daß die gewollte Wärmedifferenz in den Abteilungen zustande kommt.

Transportabler Brutschrank für fliegende Laboratorien. Für Expeditionen, Untersuchungen von Epidemien an Ort und Stelle u. s. w. wurden schon verschiedene Arten kompen-

Fig. 181.



diöser Brutschränke empfohlen; ein neuer von *Altmann* konstruierter zerlegbarer Apparat scheint vor den bisherigen Modellen mancherlei Vorzüge zu besitzen (Fig. 180). Er ist aus Aluminium mit Asbestisolation ausgeführt, daher leicht und dauerhaft. Die Zusammensetzung bietet keine Schwierigkeiten. Die Seitenwände sind durch Scharniere sicher verbunden, Ober- und Unterboden werden in die dafür vorgesehenen Falze eingesetzt, die Füße in die Seitenlöcher hineingeschoben. Eine Wasserfüllung besitzt der Apparat nicht, doch zirkuliert durch eine besondere Konstruktion in den Doppelwänden ein Luftstrom, der eine Überhitzung des Innenraumes ausschließt. Durch den

Wegfall der Wasserfüllung ist die Heizung (cf. auch S. 783), die durch eine Petroleumlampe mit Metallzylinder erfolgt, sehr sparsam. Der Zylinder ist aus Metall und besitzt ein kleines Glimmerfenster, durch das man die Höhe der Flamme kontrollieren kann. Der Brutschrank hält auch ohne Regulator gut die eingestellte Temperatur, die durch Einstellung der Flamme auf verschiedene Höhe reguliert wird.

Brutschrank zur Züchtung keimfreier Tiere. Die Gewinnung und Aufzucht keimfreier Tiere hat in den letzten Jahren dadurch an praktischer Bedeutung gewonnen und ist weit über den Rahmen des theoretischen Interesses herausgetreten, daß man auf Grund sowohl bakteriologischer und chemisch-physiologischer Experimente, als auch auf Grund von Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Darmlänge, Bakterienreichtum und Verweilen der Ingesta im Darm einerseits, erreichtem durchschnittlichen Lebensalter anderseits zu der Überzeugung kommen mußte, daß die Darmbakterien für das Leben durchaus nicht gleichgültig sind und ihr Studium von dem größten praktischen Interesse ist. Ein erfolgversprechendes zielbewußtes Studium der Darmbakterien ist nur an keimfreien Tieren möglich, nur bei ihnen kann man zu reinen, sicheren Resultaten gelangen. Ein Brutapparat zur keimfreien Aufzucht verschiedener Tierarten wird nach Angaben des Verfassers von *F.* und *M. Lautenschläger* gebaut und hat sich praktisch sehr gut bewährt. Die Anforderungen, die man an einen keimfreien Aufzuchttraum stellen muß, sind folgende: 1. das Tier muß in einem absolut keimfreien und keimdichten Raum von geeigneter Größe bei gewünschter Temperatur sowie hygienischer Luft- und Lichtversorgung untergebracht sein; 2. es muß möglich sein, die Pflege des Tieres wie unter freien Aufzuchtbedingungen zu besorgen, insonderheit ihm keimfreie Nahrung jederzeit in gewünschter Menge zuzuführen, sowie endlich Impfungen, Blutentnahmen, Stoffwechselversuche u. s. w. ohne Gefährdung der Keimfreiheit durchzuführen (cf. Fig. 181).

Aus Glas und Eisen ist ein keimdichter Raum von 120 : 60 : 120 cm gebaut. Unter dem Lattenboden befindet sich ein eiserner Auffangtrichter, der Harn und Faeces nach einem Paraffinölsyphon *P* abführt. *V* ist ein Autoklav mit Gasheizung, der eine nach außen und eine nach innen zu öffnende Tür *A* und *J* besitzt. Die Nahrung wird von außen eingestellt, im Autoklaven sterilisiert, dann bei geschlossener äußerer Tür ins Innere hereingenommen. Durch die gleichen Türen werden auch das keimfreie Junge oder die sterilisierten Bruteier eingebracht. Damit man in dem geschlossenen Kasten ohne Gefahr der bakteriellen Verunreinigung des Innern hantieren kann, sind auf den beiden Längsseiten bis zur Schulter reichende Handschuhe mit ihrem oberen Rand keimdicht eingelassen, die ein volles Einfassen des Armes (cf. *G*, untere linke Abbildung) ermöglichen. Die Handschuhe sind nach innen, außer Gebrauch, durch luftdicht anliegende Klappen *y* gegen den Luftdruck und gegen Angriffe des Tieres geschützt. Der Tierraum wird unter

Preßluft gehalten, deren Druck 25 *cm* Wasserhöhe beträgt und an dem Manometer *E* jederzeit kontrolliert werden kann. Diese Preßluft dient natürlich gleichzeitig als Atmungsluft; sie wird von einer Kolbenluftpumpe *Pp* durch Motorkraft in Bewegung gesetzt. Der Weg ist folgender: die Luft tritt durch ein dickes Wattepolster *S* (zur Zurückhaltung gröberer Verunreinigungen) in die Pumpe ein, gelangt nach dem Luftkessel *W*, der mit Hilfe des Sicherheitsventils *D* die Druckeinstellung gewährleistet, strömt durch das Gasometer *U*, durch das sterile Wattepolster *F*, durch das Schwefelsäurebad *T*, durch den Vorschlag *K*, durch ein zweites steriles Wattepolster *F*, über Stangen von Kalikausticum *M*, durch den Vorschlag *N*, nach der Heizröhre *H* (deren elektrische Heizkraft durch den Widerstand *H* eingestellt werden kann) bei *L* in den Versuchsraum, durchströmt diesen von unten nach oben und gelangt bei *E* durch ein zweites Gasometer zum Austritt. Für Arbeiten, die eine größere Lichtmenge erfordern, ist eine Glühbirnendeckenbeleuchtung *rrr* eingebaut. Da Luftmenge und Lufttemperatur regulierbar sind, so kann der Innenraum auch bei verschiedenen Außentemperaturen auf konstanter Temperatur gehalten werden. Besonderer Wert muß darauf gelegt werden, daß vor Beginn jedes Versuches sich alle Gummidichtungen, und besonders die Gummihandschuhe, in tadellosem Zustande befinden, da die kleinste Verletzung bei den wochenlang dauernden Versuchen die Keimfreiheit gefährden würde.

Über die gesamte Brutschrankindustrie darf wohl heute das Urteil gefällt werden, daß sie sehr wohl imstande ist, allen billigen Anforderungen vollkommen zu genügen, wenn man nur einen der Güte des Materials und der Sorgfalt der Verarbeitung entsprechenden Preis anzulegen in der Lage ist.

Das Plattenverfahren.

Von **M. Neisser**, Frankfurt a. M.* und **K. Beckey**, Köln.

Mit 36 Textabbildungen.

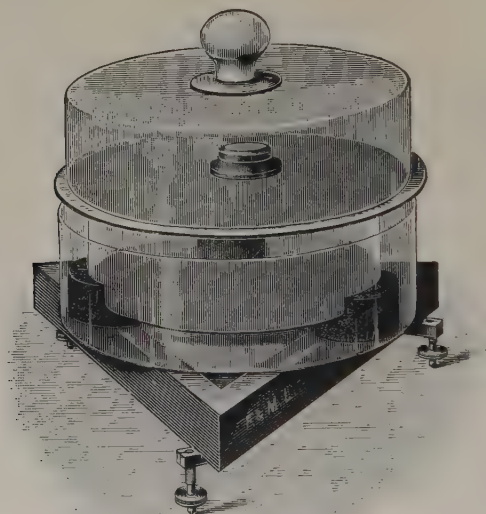
Geschichtliches.

Bevor man feste Nährböden zur Isolierung von Keimen und zur Reinzüchtung heranzog, suchte man durch Herstellung starker Verdünnungen von Flüssigkeiten die Isolierung zu erreichen. Diese Verdünnungsmethode wurde schon von *Brefeld* und *Klebs* sowie *Naegeli* und vor allem von *Lister* angewandt. Man stellte nacheinander so starke Verdünnungen her, daß schließlich in einem auf den Objektträger gebrachten Tropfen nur noch ein Keim vorhanden war, der dann durch Zusatz von Nährmedien zur Entwicklung gebracht wurde. Eine ähnliche Verdünnungsmethode stammt von *Miquel*, welcher diese Methode zur Keimzählung verwandte. Er stellte in Reagensgläsern sehr stark abgestufte Verdünnungen des Substrates in flüssigen Nährmedien her und wartete das Eintreten von Wachstum ab. Wenn einige Gläschen steril blieben, so wurde von der nächst schwächeren Verdünnung, welche Wachstum zeigte, angenommen, daß das Wachstum von einem Keime aus entstanden sei. *Droßbach* suchte eine Flüssigkeitverdünnungsmethode in Glasplatten anzuwenden, welche zahlreiche Vertiefungen aufweisen. Die Platten werden mit bakterienhaltiger, in einem bestimmten Verhältnis verdünnter Bouillon übergossen, und die über die Vertiefungen überstehende Flüssigkeit wird mit Fließpapier (steril!) abgesaugt. Nach Bebrütung in der feuchten Kammer entwickelt sich in den Vertiefungen, in welche nur ein Keim hineingelangt sein sollte, eine Reinkultur. Ähnliche noch kompliziertere und unsicherere Verfahren, durch Flüssigkeitsverdünnungen Reinkulturen zu gewinnen, sind noch vielfach beschrieben, unter andern auch für den hängenden Tropfen. Die Verdünnungsmethoden zeigen nicht nur große, kaum vermeidbare Fehlerquellen, sondern auch den grundsätzlichen Nachteil, daß sie aus einem Bakterien-gemisch immer nur die am stärksten vertretene Art zur Anschauung bringen. Einen anderen Weg schlug *Salomonsen* ein, indem er bei Sepsis bakterienhaltiges Blut in Capillaren leitete, dort erstarren ließ und so Einzelkolonien gewann, welche er durch Zerbrechen der Capillare herausfischen konnte.

* Mit Unterstützung von Dr. *W. Klein*, früher Frankfurt a. M.

Der erste, der auf festen Nährböden isolierte Kolonien zur Reinzüchtung verwandte, war wohl *Schröder* in Ferd. Cohns pflanzenphysiologischem Institut. Setzte er gekochte Kartoffelscheiben der Luft aus, so erhielt er auf der Oberfläche z. B. „rote Schleimtröpfchen“ und dazwischen auch „kleine pomeranzenfarbige Klümpchen“, die er auch auf frische Kartoffelscheiben verpflanzen konnte. *Schröder* sah also das Wachstum der Kulturen in Kolonien und verwandte die differente Farbstoffbildung in Kolonien zur Charakterisierung und Benennung der in ihnen enthaltenen Bakterien. Aber er war auf zufällig entstandene Ko-

Fig. 182.



lonien angewiesen und nicht in der Lage, die Keime eines Bakterien-gemisches zu isolieren.

Robert Koch gebührt das Verdienst, in seinem Plattenverfahren in den Jahren 1881—1883 die Methode ausgearbeitet zu haben, welche es ermöglicht, auf sog. flüssigfesten und durchsichtigen Nährböden Keime planmäßig zu isolieren und zu Einzelkolonien auswachsen zu lassen. Wenn auch dieses Plattenverfahren in der ursprünglichen Form kaum noch in Anwendung kommt, so lohnt sich doch eine kurze Schilderung, weil die jetzt üblichen Methoden nur Erweiterungen und Modifikationen des ursprünglichen *Kochschen* Plattenverfahrens darstellen. *R. Koch* benutzte anfangs Objekträger, später größere rechteckige Glasplatten, wie sie jeder Glaser schneiden kann, die in einer besonderen rechteckigen Blechbüchse trocken sterilisiert wurden. Zum Plattenguß benutzte er einen besonderen dreieckigen Apparat (s. Fig. 182), der eine mit Eiswasser gefüllte (zum Zwecke der Erstarrung der Gelatine) und mit einer ebenen Glasplatte bedeckte Schale trug. Mittels Wasserwaage und

Stellschraube ließ sich diese Plattenunterlage genau wagrecht einstellen. Nun wurde das Ausgangsmaterial in 3 oder 4 verflüssigten Gelatine-röhrchen durch Übertragen von 3 bzw. 6 Ösen verdünnt und dann auf die Glasplatten ausgegossen. Es wurde dabei nicht die ganze Platte begossen, sondern ein etwa 1 cm breiter Rand frei gelassen; dieser Rand war nötig, weil ja die Glasplatten am Rande mit den Fingern angefaßt, also an dieser Stelle nicht mehr steril waren; außerdem diente der Rand zum Aufstellen kleiner Glasleisten, die es ermöglichten, die Glasplatten übereinander aufzubauen, ohne daß sie sich berührten.

Die verschiedenen Formen von Platten- und plattenähnlichen Schalen.

So gute Resultate das *Kochsche* Plattenverfahren auch zeitigte, so wies es doch gewisse Mängel auf, die zu einer Umgestaltung herausforderten. Vor allem wurde es lästig empfunden, daß man nicht jede

Fig. 183.

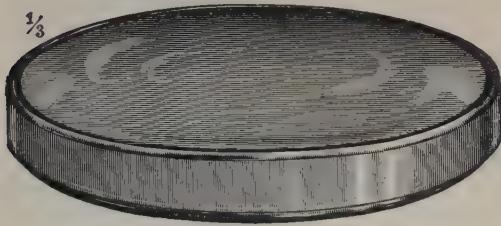


Fig. 184.



Platte für sich aufstellen und weiter benutzen konnte, sondern an die Verwendung umständlicher Apparate gebunden war. So setzten die Neuerungen an den Platten selbst ein. Diese Platten sind jetzt überall durch *Doppelschalen* oder flaschenähnliche Gefäße ersetzt; trotzdem ist man bei der alten Benennung geblieben und bezeichnet als *Plattenverfahren* jedes Züchtungsverfahren, welches feste Nährböden in *Doppelschalen* oder *Flaschen* verwendet. Die *Doppelschalen* haben mancherlei Vorteil vor den *Kochschen* Glasplatten. Der Rand der Unterschale verhindert das Überfließen von Nährbodenflüssigkeit über den Plattenrand und macht den umständlichen Nivellierungsapparat entbehrlich. Auch kann man jede beimpfte *Doppelschale* als selbständige, geschlossene Kultur behandeln, kann die Platten im Brutschrank übereinanderstellen u. s. w. Die ersten *Doppelschalen* sind von *V. Babes* (1885) angegeben, sie hatten quadratische Form; jetzt sind die gebräuchlichsten die von *Petri* angegebenen Schalen. Es sind dies ein Paar flache runde Glasschalen, von denen die eine, etwas größere, als Deckel für die andere gilt (s. Fig. 183). *Petri* gab auch solche *Doppelschalen* aus braunem Glase an, deren Deckel eine Vertiefung aufweist,

so daß die Platten übereinandergestellt werden können, ohne abzugleiten (s. Fig. 184). Die Petrischalen werden in verschiedenen Größen hergestellt. Die größten von 40 cm Durchmesser nach *Kumbari* sind besonders für Typhusuntersuchungen empfohlen worden. Im allgemeinen ist der Normaltyp von 10 cm Durchmesser am zweckmäßigsten. Diese Größe beansprucht etwa 10—15 cm³ Nährboden. Wir selbst verwenden außer diesen gewöhnlichen Petrischalen auch solche

Fig. 185.



Fig. 187.

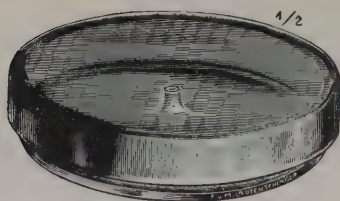


Fig. 189

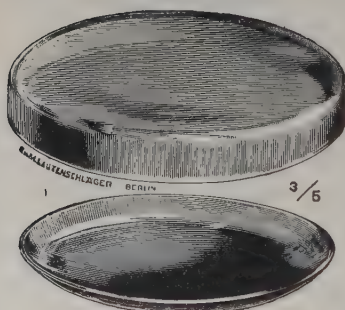


Fig. 186.



Fig. 188.

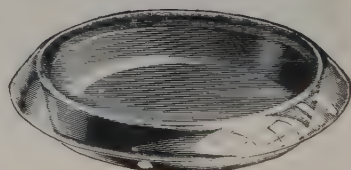
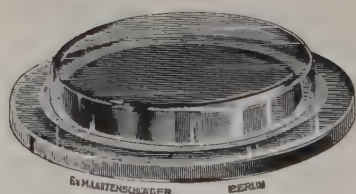


Fig. 190.



aus weißem Steingut, weil sie viel haltbarer sind als Glasschalen, u. zw. benutzen wir sie sowohl für undurchsichtige Nährböden (*Löffler-Serum*), als auch für *Endo*-Nährböden.

Die Porzellanschalen sind ein wenig höher als die Petrischalen und beanspruchen für *Endoagar* etwa 20 cm³, für *Löffler-Serum* 50 cm³ Nährboden. Für Wasseruntersuchungen nimmt *Pfuhl* Doppelschalen mit enganliegender Deckschale, so daß ein Gummiring völlig glatt über beide Schalen gelegt werden kann (s. Fig. 185). *Soyka* brachte Vertiefungen in der unteren Schale an um darin zu isolieren (s. Fig. 186).

Lentz leitete einen besonderen Luftschacht in den Boden der Unterschale (s. Fig. 187), *Krönig* läßt den Rand der Schalen nicht rechtwinklig von der eigentlichen Platte abgehen, sondern im weit offenen Winkel, so daß sich die Schalen unter Benutzung eines besonderen Halters, oder im Notfalle einer Pinzette, in der Flamme sterilisieren lassen (s. Fig. 188). Außerdem sind noch zahlreiche ähnliche Modelle (s. Fig. 189, 190, 190 a) angegeben worden, z. B. von *Wakker*, der ein dosenartiges Kulturgefäß mit einem Loch und trichterförmigem Ansatz im Deckel (zumal für

Fig. 190 a.



Fig. 191.

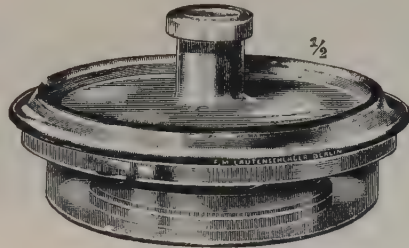


Fig. 192.

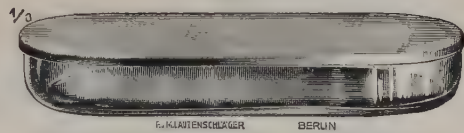


Fig. 193.



Fig. 194.



Pilzkulturen) beschrieben hat (s. Fig. 191). Da der Deckel der Platte nicht durchsichtig zu sein braucht, sind auch Metalldeckel (Aluminium) empfohlen worden (s. Fig. 192). Zum Sterilisieren und Transportieren von sterilisierten Doppelschalen dienen Blechbüchsen mit seitwärts sich öffnender Türe und Einzelfächern (s. Fig. 193), oder geschlossene Büchsen mit übergestülptem Deckel. Diese letzteren benötigen noch ein besonderes Plattengestell zum Herausziehen der Platten. Zur Kontrolle der Sterilität wird am besten eine gummierte weiße Papieretikette unmittelbar vor dem Einstellen der Büchse in den Trockensterilisator quer über den Büchsendeckel geklebt. Ist der Streifen gebräunt und unverletzt, so kann man damit rechnen, sterile Schalen zu benutzen. Will

man einzelne Doppelschalen sterilisieren, so wickelt man sie in Papier ein.

Außer diesen runden Doppelschalen werden noch für Massenkulturen viereckige Blechschalen nach *Friedberger* und *Reiter* benutzt

Fig. 195.

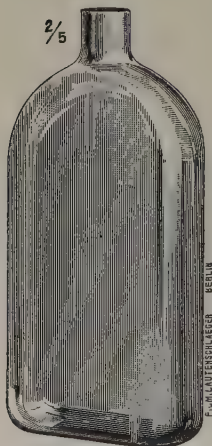


Fig. 196.

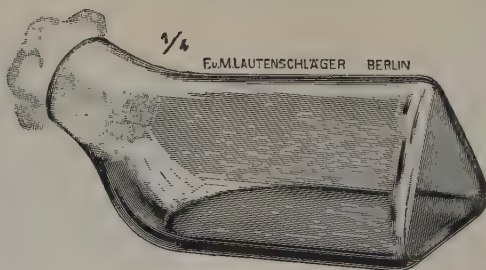


Fig. 197.

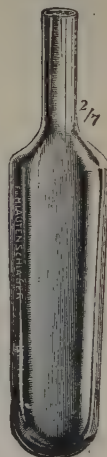


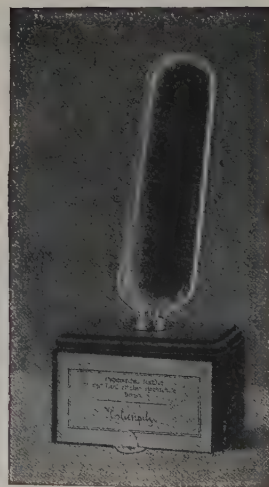
Fig. 198.



Fig. 199.



Fig. 200.



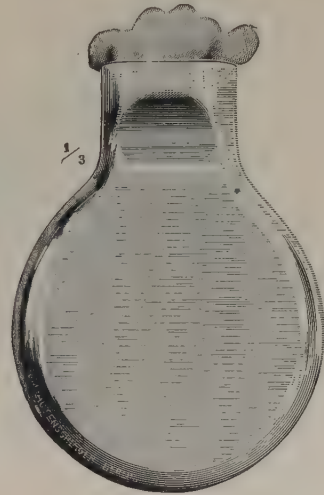
(s. Fig. 194). Ebenso für Massenkulturen sind solche Schalen geeignet, welche eine Kombination der Schalenform mit der Flaschenform haben. Diese aus einem Stück gegossenen Schalen erinnern in der Form an Feldflaschen und haben alle einen seitlich ansitzenden offenen Hals, der mit einem Wattestopfen verschlossen werden kann.

Die ersten Flaschenschalen scheinen von *Wilfarth* und *Lipéz* zu stammen; ähnliche Modelle haben *Schill* und *Kowalski* und *Langerhans* (s. *Petruschky*) und *Petruschky* und *Kamen* angegeben (s. Fig. 175—201).

Fig. 201.



Fig. 202.



Bei verschiedenen Modellen springt unterhalb des Halses eine Leiste nach innen vor, um die Benetzung des Flaschenhalses mit dem flüssigen Inhalt zu verhindern, z. B. bei der gebräuchlichen sog. Kolleschale (s. Fig. 202).

Das Gußverfahren.

Es ist nur für flüssig-feste Nährböden, also für Gelatine- und Agarnährböden anwendbar und wird noch jetzt im Prinzip nach den *Kochs*chen Angaben, wenn auch mit Benutzung der Petrischalen, gehandhabt. Die Verdünnung des Ausgangsmateriales zu Isolierzwecken erfolgt in 3 oder 4 Röhren des verflüssigten Nährbodens (Gelatine 30°, Agar 100°, nach völliger Verflüssigung abgekühlt auf etwa 43°), indem eine kleine Menge des Ausgangsmaterials in Röhren 1, davon nach gründlichem Durchmischen (unter Neigen und Drehen des Röhrens) mit ausgeglühter Öse, 3 Ösen in Röhren 2, davon mit wieder ausgeglühter Öse 6 Ösen in Röhren 3, gegebenenfalls weiter in gleicher Weise 9 oder 12 Ösen in Röhren 4 gebracht werden. Gründliche Durchmischung jedes Röhrens, sowohl mit der Öse wie auch durch Drehen und Neigen des Röhrens, wobei der oberste Rand des Röhrens nicht benetzt werden soll, ist unbedingt nötig; die Wattestopfen der Röhren können vor Beginn der Verdünnung endgültig abgenommen werden. Dann werden die Röhren vom außen anhängenden Wasser durch Ab-

trocknen befreit, an ihrer Öffnung abgeflammt und ihr Inhalt nach Erkalten des Randes in die vorher bezeichneten Platten ausgegossen, wobei die Platten nicht unnötig weit geöffnet werden sollen. Die ausgegossenen und mit ihrem Deckel versehenen Platten werden noch gründlich geneigt

Fig. 203.

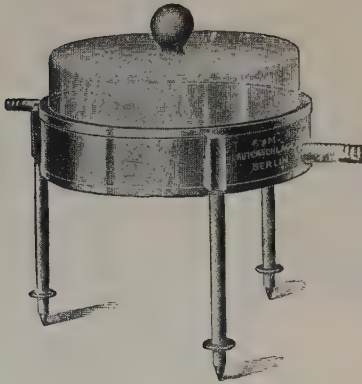


Fig. 204.

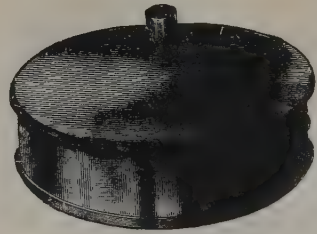


Fig. 205.

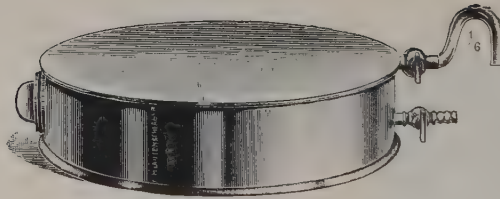
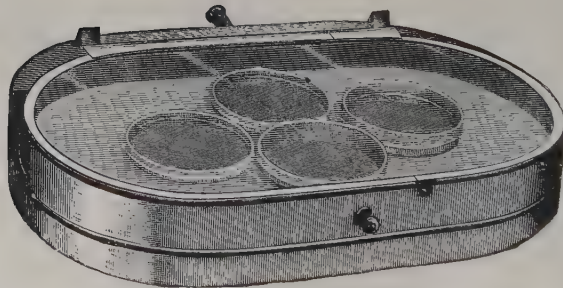


Fig. 206.



und gedreht, um nochmals möglichst gleichmäßige Verteilung der Keime zu erzielen, und dann zur Erstarrung, die natürlich schnell, d. h. vor der Möglichkeit einer Keimvermehrung, erfolgen muß, wagrecht hingestellt. Für Gelatineplatten bedarf es dazu bei höheren Zimmertempe-

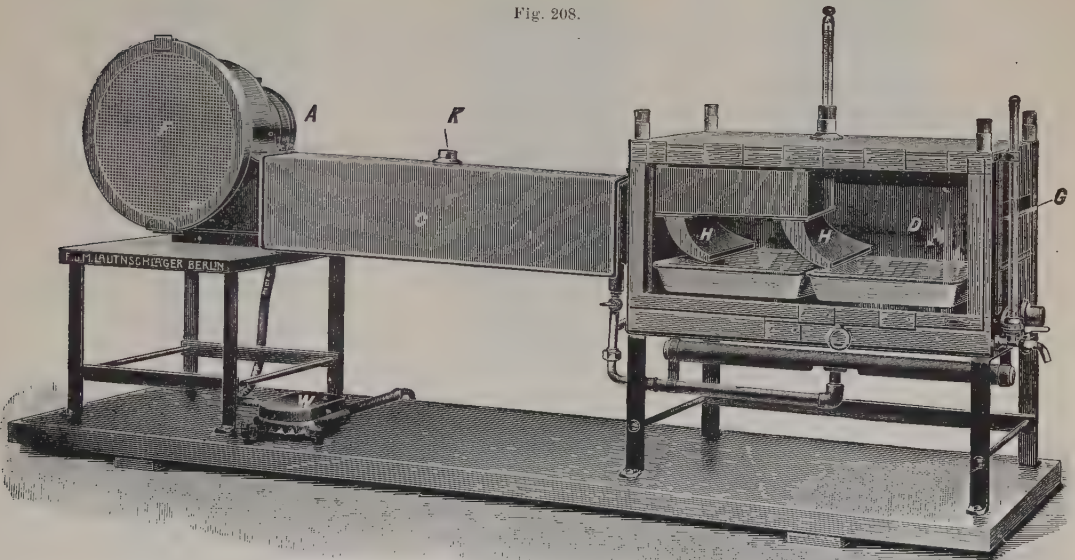
raturen besonderer Kühlvorrichtungen, wie sie für Eiswasser oder für Leitungswasseranschluß von *Pfeiffer*, *Dahmen*, *Ficker*, *Heydenreich*, angegeben worden sind (s. Fig. 203—206). Aus dünnem Bleirohr kann man sich selbst solche Kühlschlangen ohne Schwierigkeit herstellen.

Beim Guß von Agarplatten bedarf es keiner künstlichen Kühlung, denn sie erstarren bei 40° mit Sicherheit, also auch im Brutschrank. Das

Fig. 207.



Fig. 208.



Gegenteil ist eher zu befürchten, daß also beim Ausgießen des etwa 40gradigen Agars in die kalten Petrischalen vorzeitige Erstarrung eintritt und das Entstehen einer gleichmäßigen Platte vereitelt wird. Es empfiehlt sich deshalb stets, die zum Guß bestimmten Platten durch (stundenlanges) Stehen im Brutschrank oder aber durch Abflammen der inneren Oberfläche unmittelbar vor Gebrauch vorzuwärmen.

Die gegossenen Agarplatten pressen Quetschwasser am Plattendeckel und an der Nährbodenoberfläche aus, man stellt sie deshalb „verkehrt“, d. h. Deckel nach unten, in den Brutschrank. *Gärtner* hat Tondeckel angegeben, die an Stelle des Glasdeckels aufgesetzt werden und das Quetschwasser aufsaugen. *Conradi-Troch* und *Friedberger* und *Reiter* haben Einlagen aus Fließpapier u. dgl. beschrieben, die in die Deckel eingelegt und dort mit Spangen festgehalten werden, ebenfalls zum Aufsaugen des Quetschwassers (s. Fig. 207). Auch das Aufstellen der geöffneten Agarplatten (Schicht nach unten, Deckel: sterile Seite nach

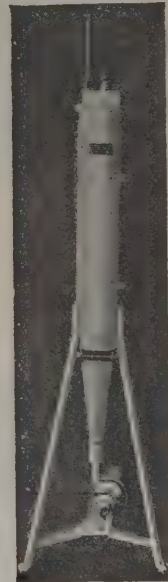
Fig. 209.



Fig. 210.



Fig. 211.



unten) auf die Drahteinlage des Brutschranks ($\frac{1}{2}$ —1 Stunde) ist beliebt. Auch im *Faustschen* Heißluft-Trockenapparat (s. Fig. 208) oder in dem von *Gins* mitgeteilten *Mündleinschen* Apparat, oder aber in dem besonders hierfür konstruierten *Schürmann-Vondranschen* Apparat (zylindrischer Apparat [s. Fig. 209—211], durch welchen elektrisch erwärmte Luft nach oberflächlicher Filtration hindurchstreicht und der ein Heben und Senken der Plattendeckel bei geschlossenem Apparat ermöglicht) kann die Trocknung erfolgen. *Zabolotnij* empfiehlt schräges Aufstellen der Platten (wir benutzen dafür für *Löffler-Serum-Platten* ein handliches Gestell für je 2 schräggestellte Platten (*F. u. M. Lautenschläger*, Frankfurt a. M.). *Rhein* empfiehlt Trocknung mittels Chlorkalcium und gibt eine zweckmäßige Anordnung an.

Das Plattengußverfahren in dieser Form ist verwendbar und empfehlenswert für die Zwecke der Keimisolation, ja es ist vielleicht das

beste Isolierungsverfahren. Es ist ferner unentbehrlich für Feststellung von Keimzahlen, also für die zahlenmäßige Bestimmung des Keimgehaltes gewisser Substrate oder für zahlenmäßige Versuchsanordnungen. Auch zur Erkennung der Kolonieförmigen der verschiedenen Bakterienarten ist das Plattengußverfahren — das jetzt vielleicht über Gebühr vernachlässigt wird — sehr geeignet, weil es sowohl oberflächliche wie tiefliegende Kolonien zeigt. Für die Gelatinenährböden ist es das allein in Betracht kommende Verfahren. Es bietet übrigens noch einen besonderen Vorteil, es läßt Bakterien im Innern der Schicht aufgehen, für welche die optimale O-Spannung geringer als an der freien Oberfläche ist (z. B. Gonokokken); es bietet schließlich die Gewähr, daß nicht zu hohe Trocknungsgrade, wie sie an der Oberfläche eintreten können, die empfindlichen Arten (z. B. Meningokokken) beeinträchtigen. Ein besonderer, nicht hoch genug zu veranschlagender Vorteil besteht darin, daß es bei Agar unmittelbar vorhergehende Erhöhung auf 100° voraussetzt; dadurch kann eine etwa im Agar vorhandene bakterielle Verunreinigung, die übersehen wurde, noch unschädlich gemacht werden. Und man bedarf zum Vorteile des Materials nur der Öse, deren Ausglühen völlige Sterilität verbürgt. Schließlich ist das Öffnen der Platte und damit diese Quelle der Verunreinigung auf ein Minimum herabgesetzt.

Diesen unleugbaren Vorteilen stehen einige praktische Nachteile gegenüber. Einmal eignet sich das Gußverfahren nicht zur Gewinnung von Massenkulturen, bei denen man eben großer Mengen Bakterien auf einer freien Fläche bedarf. Ferner ist es für die Kulturverfahren mit Differentialnährböden nicht geeignet, weil diese vielfach ein wiederholtes Aufkochen auf 100° nicht vertragen und weil Kolonien auf der Oberfläche die charakteristischen Nährbodenveränderungen deutlicher und gleichmäßiger zeigen, als die tiefen Kolonien. Hauptsächlich aber ist das Gußverfahren im praktischen Betriebe umständlich. Es setzt frisch aufzukochenden Agar und richtige Abkühlungstemperatur voraus, und so einfach das im Einzelfalle zu bewerkstelligen ist, so störend kann es im größeren Betriebe, zumal bei gleichzeitigem Arbeiten verschiedener Kräfte werden. Das Aufkochen und Abkühlen beansprucht auch Zeit, die als Unterbrechung der Tätigkeit lästig empfunden wird. Und das Abkühlen setzt Geduld, sorgfältiges Arbeiten und ein Thermometer voraus; jede Erleichterung (Schätzung der Wärme mit der Hand) aber bringt die Gefahr, daß entweder zu hohe Temperatur die Einsaat schädigt oder daß zu niedrige Temperatur vorzeitige Erstarrung der Nährböden und einen schlechten Plattensatz bringt.

Der fernere Nachteil des Gußverfahrens, daß die tiefliegenden Kolonien kleiner sind als bei einem Oberflächenverfahren und daß ihr Abstechen weniger leicht gelingt, ist zuzugeben, aber in der Hand des Geübten kein Gegengrund gegen die Anwendung des Verfahrens. Nimmt man zu alledem noch die Notwendigkeit, die gegossenen Platten nach einem der beschriebenen Verfahren zu trocknen, ohne daß man sie zu

sehr eintrocknen läßt, so ist es erklärlich, daß man dazu kam, das Plattengußverfahren durch ein bequemer zu handhabendes zu ersetzen.

Ehe wir dieses beschreiben, seien noch einige Besonderheiten des Gußverfahrens erwähnt. Zunächst hat *v. Esmarch* für Gelatine das Röhrchen selbst als Platte benutzt, in Form der nach ihm benannten Rollröhrchen; und da die zur Erstarrung der Gelatine nötige Kühlung der Rollröhrchen nicht sehr bequem war, ist auch hierfür ein besonderer kleiner Apparat angegeben: zwei mit einer Achse verbundene Scheiben, die Löcher für die Aufnahme der Röhrchen haben; die wagrechte Achse ist drehbar in einem Blechkasten angebracht, der für das Kühlwasser bestimmt ist. So kann man eine Anzahl Rollröhrchen mittels Drehung gleichzeitig kühlen (*Prausnitz*).

Man vermeidet mit den Rollröhrchen das Öffnen beim Plattenguß. Das Verfahren ist nur noch wenig in Gebrauch und für Agar nicht besonders empfehlenswert. Bei bakteriologischen Wasseruntersuchungen, bei denen ganz geringe Keimmengen zu erwarten sind (Grundwasser, Quellwasser), kann es, zumal bei Verarbeitung an Ort und Stelle, in Betracht kommen.

Auch das *v. Esmarchsche* Rollröhrchen hat durch *Schill* eine Abänderung erfahren; *Schill* rollt das Röhrchen nicht aus, sondern führt ein engeres Rohr ein, so daß der Nährboden in den Zwischenraum zwischen beide Röhrchen sich ausbreitet. (Es ist das dann eine Art anaerober *Esmarch-Röhrchen*.)

Übrigens gibt *Hesse* bereits ein Verfahren ohne Platten an, indem er Bechergläser, in denen die Nährgelatine sich befindet, ähnlich wie später *Esmarch* die Rollröhrchen, benutzt.

Aber der *Esmarchsche* Gedanke ist dann in dem Flaschenplattenverfahren weiter ausgebaut worden. Aus dem Röhrchen wurde ein feldflaschenähnliches Gefäß, das den Nährboden schon enthielt und nach Zugabe des Untersuchungsmaterials zu Platten verwendet werden konnte, ohne daß eine weitere Platte erforderlich war, und ohne daß beim Plattenguß nochmalige Öffnung stattfinden mußte.

Lindner benutzt kleine flache Fläschchen mit rechteckigem Querschnitt und nicht zu engem Hals zur Fortzüchtung von Pilzkulturen; sie sind ein Mittelding zwischen Schrägröhrchen und Platte. Man kann dazu auch die gewöhnlichen Farbtröge aushilfsweise verwenden, deren Deckel durch eingelegte Watte festerschließend gemacht werden kann.

Flaschenplatten sind gegen alle Verunreinigungen gut geschützt und dadurch für manche Fälle empfehlenswert. Besonders eignen sie sich zur Anlegung von Massenkulturen, deren Abschwemmung so besser und gefahrloser möglich ist, als bei den gewöhnlichen Petrischalen, z. B. die *Kolle-Schale* (s. Fig. 202). Auch zu Keimzählungszwecken sind manche Modelle gut brauchbar. Man hat sie für an Ort und Stelle stattfindende bakteriologische Wasseruntersuchungen angegeben, und dazu auch die eine Seite mit einem eingeritzten quadratischen Netz ver-

sehen. Zur Daueraufbewahrung von Reinkulturen, zumal in Form einzelner Kolonien sind sie gut brauchbar (s. Fig. 200 u. 201), zur Abimpfung einzelner Kolonien aber aus Gemischen — bis auf die erwähnten Farbtröge — wegen des engen Halses ungeeignet.

Erwähnt sei schließlich noch, daß das Verdünnungsverfahren für den Plattenguß auch anders, als hier beschrieben, gehandhabt wird. Es wird z. B. die Verdünnung des Ausgangsmaterials in kleinen Mengen einer sterilen Flüssigkeit (Wasser, Bouillon) vorgenommen und es werden dann die verflüssigten Nährbodenröhrchen zu den Verdünnungen gegossen, wobei zu berücksichtigen ist, daß die Verdünnung durch die geringe Menge der sterilen Verdünnungsflüssigkeit nicht so groß ist wie bei dem *Kochschen* Verdünnungsverfahren. Oder aber man macht bei quantitativen Experimentaluntersuchungen die gewünschten Verdünnungen und gibt z. B. 1 cm^3 davon nicht zum Nährboden, sondern in die leere sterile Schale, um sie dann mit dem Nährboden zu mischen. Nur bei sehr gründlicher Durchmischung, die bei Agar nicht leicht ist, gibt das Verfahren brauchbare Ergebnisse. Handelt es sich um Agar als Nährboden, so dürfen die Flüssigkeit und die Platte nicht zu kalt sein, damit nicht störende Gerinnung eine gute Durchmischung und eine glatte Platte verhindern.

Das Plattenausstrichverfahren.

Auch dieses Verfahren geht auf *Robert Koch* zurück, der bereits 1881 auf eine erstarrte Schicht (Objektträger mit Gelatineschicht) mittels der beschickten Platinnadel zahlreiche feine Striche zog und damit zu einzelnen oberflächlichen Kolonien gelangte. Er hat dann auf erstarrte Platten ebenfalls Isolierung oberflächlicher Kolonien mittels der Öse angegeben. Andere Autoren wie *Droßbach* und *v. Freudenreich* benutzten gleichfalls die Oberfläche des erstarrten Nährbodens zur Aussaat, stellten aber die Verdünnung nicht durch Ausstreichen her, sondern dadurch, daß sie in kleinen Mengen steriler Flüssigkeit verdünnten und damit die Platten übergossen, wonach dann Eintrocknen und Verdampfen mittels der Luftpumpe (*Droßbach*) oder bei Agar durch Verkehrtstellen im Brutschrank erfolgte. Ähnliches gibt auch *H. J. van't Hoff* an. Auf diese Eintrocknungs- und Verdampfungsverfahren wird noch zurückzukommen sein. Eingebürgert hat sich das Plattenausstrichverfahren erst, seitdem *Kruse* seine Pinselmethode empfohlen hatte. Er verwendete ursprünglich sterile kleine Haarpinsel (Tuschepinsel), später den von seinem Schüler *Pfaffenholz* angegebenen Platinpinsel (s. Fig. 212), der ein sicher steriles Ausstreichinstrument darstellte; er konnte damit auf einer Platte Isolierung erreichen, indem er den Platinpinsel mit einer dichten Aufschwemmung des Materials benetzte und damit ein Drittel des Nährbodens bestrich; dann wurde ausgeglüht und das zweite Drittel bestrichen und das in gleicher Weise noch einmal wiederholt. *v. Dri-*

galski und *Conradi* (s. Fig. 212 u. 213) gaben dann den bekannten Glasspatel an, einen rechtwinklig gebogenen Glasstab, mit dem sie in verschiedenen Strichrichtungen das Material auf der Oberfläche der erstarrten Agarplatte ausstrichen. Sie empfehlen ihre Methode hauptsächlich für Verarbeitung von Stuhl auf der „großen“ Petrischale. *M. Neisser* verwandte kleine sterilisierte Wattekügelchen, die mit sterilen Pinzetten gefaßt werden und ebenfalls Isolierung auf der Platte ermöglichen, wobei das lästige Ausglühen des Platinpinsels wegfällt und der Nährboden weniger zerkratzt wird. Später benutzte *M. Neisser* dann die Kuppe kleiner steriler Reagensgläser (die einzeln in größeren Zentri-

Fig. 212.



Fig. 213.

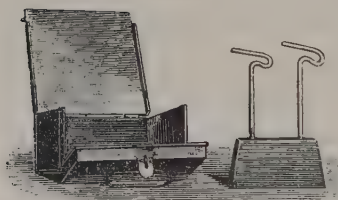
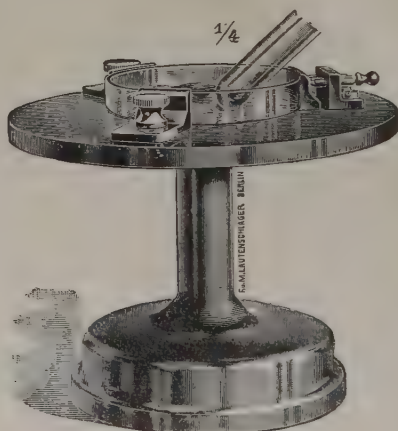


Fig. 214.



fugengläsern oder aber gemeinsam in Blechbüchsen trocken sterilisiert werden) zum Ausstreichen. Bei genügender Übung und Verwendung von drei Platten erhält man so die beste Isolierung unter völliger Ausnutzung des Nährbodens und ohne Entstehung von Rissen und Kratzern. Es gelingt so auch, eine sehr in der Minderheit vorhandene Bakterienart zu isolieren. Die richtige Ausführung dieses Verfahrens bedarf einiger Erläuterungen: Es ist am zweckmäßigsten, das Material mit der Öse auf den Nährboden zu bringen und das Verstreichen mit dem Röhrchen so vorzunehmen, daß während des Streichens die Platte dauernd gedreht wird*, während das Ausstrichröhrchen immer in der gleichen Strichrichtung geführt wird. Die Striche sollen nicht durch die Mitte der Platte gehen (dann gibt es Sternfiguren mit ungleichmäßiger Ausnutzung von Mitte und

* Eine Drehscheibe (*Lautenschläger*) (Fig. 214) erleichtert diese Manipulation, schützt auch besser gegen Verunreinigung, da die freie linke Hand den Deckel zum Schutz gegen Verunreinigung halten kann; ist aber entbehrlich.

Rand), sondern exzentrisch vom Plattenrand zur Mitte hin und wieder zurück wandernd. Das Röhrchen wird dabei nicht in seiner Längsachse gedreht, ebensowenig beim Bestreichen der zweiten und dritten Platte. Für jede Platte sind etwa 1—2 Minuten zu rechnen. Das benutzte Ausstreichröhrchen muß natürlich ebenso sorgfältig vernichtet werden (zurückstecken in das weitere Reagensglas, oder in eine zweite Büchse oder Einlegen in eine Desinfektionslösung) wie das beim *Drigalski-Conradi*-Spatel nötig ist. Erwähnt sei noch, daß *Jakobsthal* (Hamburg) ein ähnliches Verfahren benutzt.

Das so bequeme und deshalb allgemein, wenn auch in verschiedener Weise verwendete Plattenaustreichverfahren birgt eine Reihe Fehlerquellen. Er setzt zunächst trockene sterile Nährbodenplatten von nicht zu weicher Konsistenz voraus; des letzteren Grundes halber ist es für Gelatineplatten nicht empfehlenswert, und für weiche Nährböden, wie Ascitesagar, nur mit großer Vorsicht anwendbar. Die Nährbodenplatten müssen vor dem Gebrauch genügend getrocknet werden (s. im vorigen Abschnitt); geschieht das eine oder ganz wenige Stunden vor dem Gebrauch, so ist die Gefahr einer störenden bakteriellen Verunreinigung nicht sehr groß; werden die Platten aber, wie das bei größeren Betrieben gewöhnlich geschieht, im Vorrat gegossen, und so einen oder mehrere Tage aufbewahrt, so kann es zum Auswachsen einzelner beim Gießen auf die Platten gelangten Keime zu Kolonien kommen, die durch ihre Kleinheit der Beobachtung entgehen und beim Austreichen mit verrieben werden. Zumal bei nicht völlig klarem oder aber bei undurchsichtigem Nährboden (z. B. *Löffler*-Serum) werden solche kleine Bakterienansiedlungen leicht übersehen. Durch Aufbewahrung im Eisschrank schränkt man zwar die Vermehrung ein, erschwert aber auch die Erkennbarkeit der etwa doch in Vermehrung begriffenen Verunreinigungskeime, bei Brutschranktemperatur anderseits wird die Austrocknung leicht zu stark, denn die Austrocknung darf auch nicht zu weit gehen, da manche Keime (z. B. Ruhrbacillen, Meningokokken) sehr empfindlich gegen Austrocknung sind. Es empfiehlt sich deshalb, die Nährbodenplatten vor dem Gebrauch nicht länger als etwa einen Tag (bei Zimmertemperatur) stehen zu lassen; unmittelbar vor dem Gebrauch ist jede Platte genau auf etwa vorhandene kleine Kolonien durchzusehen. Beim Austreichen selbst, bei dem ja jede Platte etwa 1—2 Minuten offen steht, ist Vorsicht nötig, damit nicht stark bakterienhaltige Teilchen (Haare, Hautschuppen) auf die Platte fallen und mit verarbeitet werden. Das Austreichen darf auch nicht in stark bewegter, staubiger und keimhaltiger Luft erfolgen. Die zum Austreichen gebrauchten Instrumente (Spatel oder Röhrchen) müssen sicher steril sein. Zerkratzen des Nährbodens bewirkt unregelmäßige Kolonieformen und Zusammenfließen von Kolonien infolge der entstehenden freien „Wasserstraßen“. Besonders störend können beim Oberflächenverfahren die über die Platten fortwandernden Bakterienarten (z. B. *Proteus*) werden. Nach *H. Braun* und

R. Salomon läßt sich das durch einen kleinen Zusatz von Carbolsäure zum Nährboden verhindern, ohne daß manche anderen Keime dadurch beeinträchtigt werden.

Im allgemeinen läßt sich sagen, daß zur Isolierung der in einem Substrat (z. B. Eiter) hauptsächlich vorhandenen Keime das Ausstreichen auf eine Platte mit der Öse in der oben beschriebenen Weise genügt, daß aber zur sicheren Erreichung wirklich guter Keimisolierung drei Platten nötig sind; zum Ausstreichen ist dann die Verwendung des Reagensglases oder des *Drigalski*-Spatels erforderlich.

Für große Platten ist der *Drigalski*-Spatel am bequemsten.

Es ist klar, daß das Plattenausstrichverfahren zumal für die Isolierung von Keimen aus Gemischen in Betracht kommt, daneben auch zur Erkennung der Formen von oberflächlichen Kolonien. Besonders geeignet ist es für die Anwendung von Differenzierungsnährböden, also von Nährböden, die durch Verwendung eines Indicators die Zersetzung besonderer, dem Nährboden zugesetzter Stoffe durch bestimmte Bakterienarten anzeigen.

Für quantitative Versuche ist es in der beschriebenen Form im allgemeinen nicht anwendbar. Da aber auch hierfür ein Bedürfnis vorlag, so entstanden Verfahren, welche den Vorzug des Oberflächenverfahrens für zahlenmäßige Versuche ausnutzten. Nachdem schon *Droßbach*, *v. Freudenreich* und *H. J. van't Hoff* diesbezügliche Angaben gemacht hatten, war es *v. Esmarch*, der durch seine Schule das Abblasverfahren ausgestaltet und allgemeiner bekannt gemacht hat. Es werden dazu fertig gegossene Agarplatten mit den entsprechenden Verdünnungen eines auf Keimzahl zu untersuchenden Wassers übergossen und es wird dann das Wasser durch einen warmen Luftstrom in einem besonderen Kasten zur Verdampfung gebracht. Bei genau wagrechter Lagerung der Platten entstehen gut isolierte Kolonien. Bei geringen Flüssigkeitsmengen (etwa $\frac{1}{2} \text{ cm}^3$) kann das Verdampfen auch ohne besondere Vorrichtung im Brutschrank (bei geöffneten Platten) stattfinden. Man muß dann Vorsorge gegen Verunreinigung treffen, indem z. B. der Brutschrank während der Trocknung nicht geöffnet werden darf. Auch dies Verfahren ist dann modifiziert worden, indem z. B. *Gins* im Frankfurter Institut den *Fausts*chen Trockenapparat und eine besondere Drehscheibe benutzte, später aber den besonders hierfür von *Mündlein* konstruierten Apparat verwendet hat (s. Abschnitt „Keimzählung“). Das Wesentliche des Apparates besteht — außer in dem elektrischen Ventilator und der elektrischen Heizvorrichtung (*Föhn*) — in der langsamen Drehung der Platten während des Trocknens. Dadurch entstehen Platten mit sehr gleichmäßig verteilten Kolonien. Der von *Schürmann-Vondran* (s. Fig. 209—211) für die gleichen Zwecke angegebene Apparat entbehrt dieses Vorteils, besitzt aber eine andere, nicht unwichtige Vorrichtung, dadurch, daß er Öffnen und Schließen

der Platten im geschlossenen Apparat erlaubt. Er ist röhrenförmig gebaut und kann 10 Platten übereinander aufnehmen.

Alle diese Abblasverfahren schützen nicht mit Sicherheit vor Keimverunreinigungen und alle angebrachten Filter heben diese Verunreinigungsquelle nicht sicher auf. Aber das vermindert ihren Wert für die quantitative Wasseruntersuchung und auch für die zahlenmäßige Feststellung bestimmter Bakterienarten im Wasser nicht erheblich. Diese Verfahren ermöglichen es auch, in keimarmen flüssigen Substraten die Keimarten und Mengen festzustellen, ohne daß Fällungen oder sonstige Konzentrierungsmaßnahmen erforderlich sind.

Aus dem hier erwähnten Bedürfnisse des zahlenmäßigen Nachweises von wenigen Keimen in größerer Menge Flüssigkeit ist dann das Sprühverfahren von *Spitta-Müller* entstanden, bei dem eine bestimmte Flüssigkeitsmenge unter Zuhilfenahme einer einfachen Vorrichtung auf eine sterile Tonplatte aufgegossen und mittels komprimierter Luft in feinsten Tröpfchen auf eine Nährbodenplatte versprüht wird. Näheres darüber im Abschnitt „K e i m z ä h l u n g“.

Übrigens hat man für apathogene Keime schon früher eine Verspritzung mittels Gummigebläse verwandt.

Schließlich sei noch das Gipsplattenverfahren von *Arno Müller* für die gleichen Zwecke erwähnt, das im Abschnitt „Keimzählung“ genauer beschrieben ist.

Für die Züchtung der Anaeroben sind die gewöhnlichen Plattenverfahren brauchbar, wofern sie geeignete (Zucker-) Nährböden enthalten und in O-freien Räumen bebrütet werden. Die hierfür angegebenen zahlreichen Modelle wie Glasglocken für O-Verdrängung durch H (man hat auch ganze Brutschränke für N-Füllung konstruiert) sind an anderer Stelle beschrieben.

Aber es sind auch besondere Plattenmodelle für anaerobe Kultivierung mittels O-Absorption oder O-Verdrängung mitgeteilt worden, über die ebenfalls an anderer Stelle berichtet wird.

Erwähnt werde noch, daß man auch die gewöhnlichen, oder (besser) weiteren Reagensröhrchen mit schräg erstarrtem Agar zu einer Art Plattenverfahren benutzt, indem man das Kondenswasser als Verdünnungsmedium verwendet und es über den Schrägagar laufen läßt. *Banti* und *Grasglick* haben über dieses „Verfahren“ Mitteilung gemacht.

Soll das Plattenverfahren zu differentialdiagnostischen Untersuchungen verwendet werden, so wendet man die schon erwähnten Nährböden mit Zusätzen an, z. B. Kreide zur Erkennung der Säurebildung.

Dient das Plattenverfahren zu Zählzwecken, so ist besondere Technik und Beurteilung erforderlich, über die an anderer Stelle berichtet wird.

Es ist noch einiges darüber zu sagen, wann das Plattenverfahren zur Isolierung und Reinkulturgewinnung angewendet wird. So sicher es in der Hand des Geübten und sorgsam Arbeitenden sein kann, so vielen Fehlerquellen ist es bei Unterlassung gewisser Vorsichtsmaßregeln aus-

gesetzt. Schon die oberflächliche Betrachtung des ausgewachsenen Plattensatzes zeigt, ob er richtig ausgefallen ist; denn welches Verfahren man auch anwenden mag, es muß sich ein sehr deutlicher Dichtigkeitsunterschied in den drei oder vier angewendeten Verdünnungsgraden, u. zw. entsprechend der markierten Reihenfolge, zeigen. Treten aber in dieser Beziehung Unstimmigkeiten auf, so liegt ein Versuchsfehler vor, der das ganze Verfahren als zweifelhaft, ja meist als unwertbar erscheinen läßt. Ob dann ein unsteriles Nährbodenröhrchen, eine unsterile Platte, ein unsteriles Ausstreichinstrument oder ein sonstiger Versuchsfehler vorliegt, ist gewöhnlich nicht zu entscheiden und auch gleichgültig. Auf diese Betrachtung mit bloßem Auge muß in jedem Falle die Lupendurchmusterung folgen. Es kann nicht oft genug gesagt werden, daß diese unentbehrlich ist, und ein bakteriologischer Arbeitsplatz ohne Lupe (etwa 6—8fache Vergrößerung) muß als unvollständig angesehen werden. Das sei auch den Kurzsichtigen gesagt, welche häufig glauben, ohne Lupe auszukommen. Langjährige Erfahrung hat uns aber vom Gegenteil überzeugt. Der eine von uns (*Neisser*) hat schon 1895 kleine Kolonien beschrieben, die niemals mit bloßem Auge sichtbar, häufig sogar nur mit dem Mikroskop (schwache Vergrößerung) erkennbar sind; *H. Braun* und *Schäffer* haben einen *Hauchbacillus* beschrieben, dessen Kolonien auch von erfahrenen Bakteriologen nicht als solche erkannt wurden. Und ebenso kommt es vor, daß eine völlig verunreinigte Agarplatte für trüb gehalten wird, nur weil die unendlich vielen kleinen Kolonien nicht erkannt werden. Am schwierigsten aber ist mit bloßem Auge die Feststellung, ob eine Kolonie wirklich nur 1 Kolonie ist, oder ob 2 Kolonien vergesellschaftet sind. Darüber kann auch in manchen Fällen nur die mikroskopische Betrachtung (schwache Vergrößerung) Aufschluß geben. Wenn man z. B. *Xerosebacillen* und *Influenzabacillen* auf gewöhnlichem Agar austreibt, so entstehen innerhalb der *Xerosekolonien*, nahe ihrem Rande kleinste *Influenzokolonien*, die niemals mit bloßem Auge sichtbar sind. In solchen Fällen gibt ja das Grampräparat Aufschluß. Wenn es sich aber um vergesellschaftete Kolonien von *Streptokokken* und *Pneumokokken* oder aber von *Koli-* und *Dysenteriebacillen*, von *Diphtheriebacillen* und *Diphtheroiden* handelt, dann entstehen beim Abimpfen Kulturen, welche die merkwürdigsten „Wandlungen“ im Laufe der weiteren Kultivierung und Untersuchung zeigen. Bei jeder wirklich wichtigen Reinkultivierung darf deshalb nur von einer Kolonie, die mit Lupe (oder besser Mikroskop) als rein erkannt ist, ausgegangen werden, und auch dann noch empfiehlt es sich sehr, die gewonnene Reinkultur noch einmal einem Plattenisolierv erfahren zu unterziehen. In einer guten Bakterienreinkultursammlung dürfte keine Kultur sein, die nicht mindestens zweimal auf die angegebene Weise reingezüchtet wurde.

Undurchsichtige Nährböden, wie *Löffler-Serum* oder schlecht durchsichtige, wie *Malachitgrünplatten* oder trübe, flockige *Agarplatten* sind

deshalb zur Reinkultivierung nur mit großer Vorsicht brauchbar. Zumal bei *Löffler*-Serumplatten können auch ganz vereinzelte, als rein erscheinende Kolonien zweierlei Bakterienarten enthalten. Auf diese Fehlerquelle kann bei der Reinzüchtung nicht genug geachtet werden.

Geschieht das Abstechen einer isolierten Kolonie unter Beobachtung einer Lupe, so kann man auch die Uhrmacherlupe, die nach Art eines Monokels ins Auge festgeklemt ist, benutzen. Oder man benutzt die Präparierstative der Zoologen (s. die Kataloge von *K. Zeiß* und *E. Leitz* oder *R. Winkel*) mit wagrechter Stellung der Platten. Am zweck-

Fig. 215.



mäßigsten ist aber senkrechte Stellung der Platten. Der von *Neisser* angegebene Zählapparat (s. „Keimzählung“, dort auch Abbildungen) eignet sich auch besonders gut zum sauberen Abstechen von isolierten Kolonien. Man kann sich diesen Apparat auch aus Holz improvisieren, entsprechend Fig. 215. Während die Platten gegen das Tageslicht aufgestellt werden, hält die eine Hand die Lupe, die andere die Abstichnadel. Wer ohne Stativ (aus freier Hand) abstechen will, sucht sich eine bestimmte Kolonie aus, betrachtet sie erst gegen das Licht mit der Lupe und sticht sie dann, auch gegen das Licht, ab. Für manche Fälle ist das Abstechen unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung unentbehrlich. Für das Arbeiten mit *Zeiß* AA oder A oder mit *Leitz* 3 ist einige Übung erforderlich, da ja das Mikroskop umgekehrte Bilder liefert, also Koordination der sich umgekehrt zeigenden Bewegungen anfangs nicht leicht ist. Dazu kommt, daß weder der Glasrand noch das Mikroskopobjektiv mit der Nadel berührt werden dürfen. Für den Geübten aber

gibt es keine sicherere Methode der Abimpfung. Am meisten empfiehlt sich das schwache Objektiv A_2 von Zeiß mit seinem Abstand von etwa $3\frac{1}{2}$ cm vom Objekt. Diese 15fache Vergrößerung genügt völlig. Mit einem solchen Objektiv (angängig ist auch Leitz 1), das nicht angelegentlich genug empfohlen werden kann, ist es auch nach kurzer Übung möglich, garantiert reine Kolonien abzustechen. Es sind auch Hilfsapparate für das mikroskopische Abstechen angegeben worden, sog. Harpunen (siehe Fig. 216 u. 217), die am Objektiv bzw. Tubus angebracht werden. Die erste derartige Harpune hat wohl Prausnitz angegeben. Später haben Unna und Freymuth-Lickfett ähnliche Apparate angegeben. Für die Geübten

Fig. 216

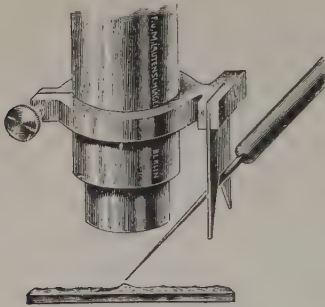


Fig. 217.



sind sie entbehrlich, für die Ungeübten haben sie nicht die Gewähr sterilen Arbeitens.

Es sei hier das *Burrische* Verfahren angeschlossen, das für manche Zwecke wichtig ist; es dient dazu, Keime, die man mikroskopisch als ganz isoliert liegend erkannt hat, auf Platten zu kleinen Kolonien auswachsen zu lassen und damit zur Weiterverimpfung die sichere Reinkultur vorzubereiten.

Das Photographieren der Platte kann in der Durchsicht oder in der Aufsicht geschehen, häufig sind beide Ansichten zur charakteristischen Darstellung erforderlich. Für manche Zwecke kann es genügen, die Platten auf lichtempfindliches Papier zu stellen und in der Durchsicht zu beleuchten.

Die Konservierung von charakteristischen Plattenkolonien ist eine insofern undankbare Aufgabe, als der Agar immer weiter schrumpft und auch Krystallbeläge und Risse zeigt. Dazu kommt, daß bei Temperaturerniedrigung natürlich immer Beschlagen der Deckplatte mit Kondenswasser eintritt. Immerhin kann man auch ohne die besondere Kunstfertigkeit, welche die Hersteller von Musealobjekten besitzen, charakteristische Kolonien für Wochen und Monate konservieren. *Soyka* und *Král* machen starke Verdünnung des Kulturmateri als nacheinander in 6 Tropfen sterilen Wassers und impfen von der letzten Verdünnung kleine Flaschenplatten, die sie nach guter Erstarrung und Verdampfung des Wassers zuparaffinieren (bzw. zuschmelzen) und senkrecht auf-

stellen. *Czaplewski* nimmt Petrischalen, deren Zwischenraum er mit Paraffin ausgießt. *Paul* nimmt zum Verschluß der Petrischale statt des Deckels eine besondere Glasplatte, die eine der „Untertasse“ entsprechende Rinne hat.

Man hat auch die Zwischenräume von Ober- und Unterplatten mit Bindfaden oder Watte ausgefüllt und nachher paraffiniert, oder einen breiten Gummiring um beide Platten gelegt, wofür auch besondere Plattenmodelle angegeben sind; es genügt natürlich auch Umkleben mit Plastilin (nach *Hauser*).

Schließlich sei erwähnt, daß man zum Studium der eigenartigen Anordnung der Bakterien in Kolonien auch Methoden angegeben hat, um Platten mit Kolonien zu härten, mikroskopisch zu schneiden und zu färben, um dadurch Einblick in den Bau der Kolonien zu gewinnen.

So haben *Jacobi* sowie *Fischl* und *Weigert* Platten mit 1%iger Lösung von Kaliumbichromat übergossen, sie dann nach einigen Tagen gewässert, in Alkohol gehärtet und Teile davon geschnitten. *A. Neisser* hat Gelatinestichkulturen in ähnlicher Weise geschnitten und gefärbt und *Winkler* hat ein entsprechendes Verfahren für Stich- oder Schüttelkulturen für Agar angegeben. *Pick* und *Saul* haben statt der Härtung mit Kaliumchromat das Formalin angegeben. Eine ausführliche Beschreibung dieser Verfahren gibt *Heim* in der 5. Auflage seines Lehrbuches der Bakteriologie, S. 135.

Auch einzelne Kolonien kann man nach *Garrè* oder *Günther* ausschneiden und in Glyceringelatine unter Deckglas konservieren.

Literatur: *Banti* u. *Grasglick*, Zbl. f. Bakt. 1895, I. Abt., XVII. — *H. Braun* u. *R. Salomon*, Zbl. f. Bakt. 1918, I. Abt., Orig. LXXXII. — *Braun* u. *Schäffer*, Zt. f. Hyg. 1919, LXXXIX. — *Brefeld*, Botan. Unters. über Schimmelpilze, 1872, I. — *Burri*, Das Tuscheverfahren. G. Fischer, Jena 1909. — *Conradi-Troch*, M. med. Woch. 1912. — *Czaplewski*, Zbl. f. Bakt. 1889, VI. — *v. Drigalski-Conradi*, Zt. f. Hyg. 1902, XXXIX. — *Droßbach*, Zbl. f. Bakt. 1892, XII; Zbl. f. Bakt. 1893, XIII. — *v. Esmarch*, Zt. f. Hyg. 1886, I. — *v. Freudenreich*, Zbl. f. Bakt. 1894, XV. — *Friedberger-Reiter*, Zt. f. Immun. 1911, XI. — *Garrè*, Fortschritte der Medizin 1886. — *Gins*, Veröffentl. a. d. Geb. d. Medizinalverw., III, H. 6. — *Günther*, D. med. Woch. 1889. — *Heim*, Lehrb. d. Bakt., 4. Aufl., Encke 1918. — *Hesse*, Zt. f. Hyg. 1888, IV. — *Heydenreich*, Zt. f. wiss. Mikroskopie, IX. — *H. J. van't Hoff*, Zbl. f. Bakt. 1897, I. Abt., XXI. — *Kamen*, Zbl. f. Bakt. 1891, IX. — *Klebs*, A. f. exp. Path. 1873. — *R. Koch*, Mitt. a. d. kais. Ges. 1881, I; Zt. f. Hyg. 1893, XIV. — *Kruse*, Zbl. f. Bakt. 1894, XV. — *Lipez*, Zbl. f. Bakt. 1887. — *Lister*, Transact. of the pathol. soc. London 1878, XXIX. — *Marmann*, Zbl. f. Bakt., I. Abt., Orig. LVI. — *Miquel*, Ann. de l'obs. de Montsouris 1879, 1885, 1886. — *Arno Müller*, Arb. a. d. kais. Ges. 1914, XLVII. — *M. Neisser*, Zt. f. Hyg. 1895, XX; D. med. Woch. 1903, Nr. 26; s. *Marx*, Diagnostik etc. Hirschwald, Berlin 1902. — *Paul*, Zbl. f. Bakt. 1894, XVI. — *Petruschky*, Zbl. f. Bakt. 1890, VIII. — *Prausnitz*, Zbl. f. Bakt. 1891, IX. — *Rhein*, Zbl. f. Bakt., Orig. LXXXVIII, S. 557. — *Salomonsen*, Bot. Ztg. 1876 u. 1880 u. Techn. elem. de Bact. Paris 1891. — *Schäffer*, Berl. kl. Woch. 1919, Nr. 5. — *Schüll*, Zbl. f. Bakt. 1889, V. — *Schröder*, Cohns Beitrag zur Biologie der Pflanzen, 1872, I, H. 2. — *Schürmann-Vondran*, M. med. Woch. 1917, Nr. 18. — *Soyka* u. *Král*, Zt. f. Hyg. 1888, IV. — *Spitta-Müller*, Arb. a. d. kais. Ges. 1909, XXXIII. — *Wakker*, Zbl. f. Bakt. 1894, XVI. — *Wilfarth*, D. med. Woch. 1887, Nr. 21.

COUNTWAY LIBRARY



HC 4BQP 9

